

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representation of  
The original documents submitted by the applicant.

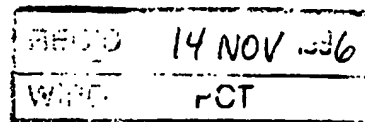
Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

## **IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Bescheinigung

### PRIORITY DOCUMENT

Herr Dr. Wolfgang-M. F r a n z in Groß Grönau/Deutsch-  
land hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Vektor-System zur spezifischen in vivo  
Genexpression in Herzmuskelzellen"

am 1. Oktober 1996 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wie-  
dergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmel-  
dung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die  
Symbole C 12 N und A 61 K der Internationalen Patentklas-  
sifikation erhalten.

München, den 24. April 1997

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

HofB

Aktenzeichen: 196 40 630.7



## Vektor-System zur spezifischen in vivo Genexpression in Herzmuskelzellen

Anmelder: Dr. Wolfgang-M. Franz

Erfinder: Dr. Wolfgang-M. Franz, Thomas Rothmann, Prof. Dr. Hugo A. Katus

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Vektor-System, welches in vivo eine spezifische Genexpression in Herzmuskelzellen ermöglicht.

Das erfindungsgemäße Vektor-System ist Bestandteil eines viralen oder nicht-viralen Genshuttles, in dem ein beliebiges Gen bzw. ein beliebiger funktioneller DNA-Abschnitt gekoppelt an die regulatorische DNA-Sequenz der kardialen Myosin Leichtkette (MLC) -2 inkloniert ist.

Anwendungsbeispiele sind die Medizin, die Gentechnik und die pharmazeutische Industrie.

Dieses Vektorsystem verfügt über die Eigenschaft zur spezifischen Genexpression im Herzmuskelgewebe bevorzugt im Ventrikel in vivo, so daß ein beliebiges Gen, gekoppelt an die regulatorische DNA-Sequenz von Myosin Leichtkette (MLC) -2, mit unterschiedlicher Zielsetzung spezifisch exprimiert werden kann.

### Patentansprüche

1. Vektor-System zur spezifischen in vivo Genexpression in Herzmuskelzellen, bevorzugt im Ventrikel, dadurch gekennzeichnet, daß es Bestandteil eines viralen oder nicht-viralen Genshuttles ist, in dem ein beliebiges Gen bzw. ein beliebiger funktioneller DNA-Abschnitt gekoppelt an die regulatorische DNA-Sequenz von MLC-2 inkloniert ist.

2. Vektor-System nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das beliebige Gen bzw. der beliebige funktionelle DNA-Abschnitt eine Intron- und Poly A-Sequenz enthält.

3. Vektor-System nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß Teile oder Varianten der regulatorischen MLC-2 Sequenz der Ratte oder einer anderen Spezies, bevorzugt des Menschen oder eines Säugetieres, eingesetzt werden.

4. Vektor-System nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß ein virales Genshuttle-System eingesetzt wird.

5. Vektor-System nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß ein replikationsdefizientes adenovirales Genshuttlesystem eingesetzt wird.

6. Vektor-System nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß ein Adeno-assoziiertes Genshuttle-System eingesetzt wird.

01.10.96

7. Vektor-System nach Anspruch 1 bis 3,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
ein nicht-virales Genshuttlesystem eingesetzt wird.

8. Vektor-System nach Anspruch 1 bis 3,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
ein Genshuttle auf der Basis einer Lipofektion eingesetzt wird.

9. Verwendung des Vektor-Systems nach Anspruch 1 bis 3,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
es als Bestandteil eines viralen bzw. nicht-viralen Genshuttles die gezielte Expression einer  
therapeutischen DNA steuert, welche bei einer zu behandelnden Krankheit qualitativ oder  
quantitativ verändert werden soll.

10. Verwendung des Vektor-Systems nach Anspruch 1 bis 3 zur Gentherapie, wobei das  
Vektor-System konfektioniert und über die Blutbahn, vorzugsweise über ein modifiziertes  
thetervfahren in das arterielle oder venöse Koronarsystem appliziert wird.

01-10-96 21:59

Dr. Wolfgang-M. Franz

+49-4569-1002

## Beschreibung

### Herzmuskel-spezifische Genexpression durch replikationsdefiziente rekombinante Adenoviren

#### Abstrakt

Rekombinante Adenoviren sind vielversprechende „Shuttle“-Vektoren für eine zukünftige Gentherapie von Herzmuskelerkrankungen. Ihre Fähigkeit verschiedene Zelltypen zu infizieren, kann jedoch zur Expression von vermeintlich therapeutischen Genen außerhalb des Herzmuskels und damit zu unerwünschten Risiken führen. Um die Genexpression auf Kardiomyozyten zu beschränken, wurde ein rekombinantes Adenovirus (Ad-mlcLuc) konstruiert, in dem der Herzmuskel-spezifische „myosin light chain“-2v (mlc-2v Promotor der Ratte die Transkription eines Luciferase-Reportergens reguliert. Als Kontrollen wurden die entsprechenden adenoviralen Konstrukte ohne Promotor (Ad-Luc) und mit dem „Rous Sarkoma Virus“ (RSV) (rsv) Promotor (Ad-rsvLuc) erstellt. Unsere Daten zeigen, daß der rekombinante Vektor Ad-mlcLuc *in vitro* spezifisch in primären Rattenkardiomyozyten, nicht jedoch in drei etablierten Zelllinien (HeLa, H9c2 und A10) aktiv war. Durch die Injektion der rekombinanten Adenoviren in die Herzkammer von neonatalen Ratten wurde die Herzmuskel-spezifische Genexpression von Ad-mlcLuc *in vivo* bewiesen, obwohl unterschiedliche Mengen adenoviraler DNA durch PCR-Analysen in allen untersuchten Geweben der infizierten Tiere nachweisbar waren. *In vitro* und *in vivo* war der mlc-2v Promotor spezifisch in Herzmuskelzellen aktiv, und erreichte dort 8-9 % der Luciferaseaktivität des rsv-Promotors. Die direkte Injektion von Ad-mlcLuc in den Oberschenkelmuskel neonataler Ratten ergab nur eine Hintergrundaktivität für Luciferase von etwa 0.05 % im Vergleich zu Ad-rsvLuc. Im adenoviralen „Shuttle“-Vektor-System ermöglicht der mlc-2v Promotor die Herzmuskel-spezifische Genexpression eines Fremdgens und ist daher ein nützliches Vehikel für einen gerichteten Gentransfer in das Herz.

**Schlüsselwörter:** Adenovirus, Herzmuskel, Myosin Leichtkette-2v Promotor, Genexpression

#### Einleitung

Der neu etablierte adenovirale Vektor Ad-mlcLuc ist *in vitro* spezifisch in Herzmuskelzellen neonataler Ratten aktiv. Darüberhinaus führt der „myosin light chain-2v“ (mlc-2v) Promotor *in vivo* zu einer spezifischen Luciferase-Expression im Herzen. In 11 anderen untersuchten Geweben (Interkostalmuskel, Thymus, Lunge, Diaphragma, Bauchmuskel, Leber, Magen, Milz, Niere, Gehirn und Quadriceps femoris) kam es durch den mlc-2v Promotor zu keiner Luciferase-Expression, obwohl in diesen Geweben mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Southernblot adenovirale DNA nachgewiesen werden konnte. Die direkte Injektion von Ad-mlcLuc in den Oberschenkelmuskel neonataler Ratten bestätigte, daß der mlc-2v Promotor nicht im Skelettmuskel, sondern nur im Herzmuskel aktiv ist. Adenovirale Vektoren, bei denen ein Fremdgen unter Kontrolle des mlc-2v Promotors steht, stellen somit ein nützliches Vehikel für einen gerichteten Gentransfer in das Herz dar.

#### Ergebnisse

##### Konstruktion der rekombinanten Adenoviren

Zur Bestätigung der Spezifität des mlc-2v Promotors wurden drei verschiedene rekombinante Adenoviren hergestellt (siehe Abbildung 1 a-c). Die Konstruktion der replikationsdefizienten Adenoviren erfolgte durch homologe Rekombination der klonierten Plasmide pAd-mlcLuc, pAd-rsvLuc und pAd-Luc mit dem zuvor isolierten großen ClaI Fragment der del324-

01-10-96 21:59

Dr. Wolfgang-M. Franz

+49-89-2738694

503

Mutante des Adenovirus 5. Nach Kotransfektion in 293-Zellen wurden virale Plaques auf die korrekte Integration des Transgens untersucht und klonal auf 293-Zellen vermehrt. Die rekombinanten Adenoviren tragen das Luciferasereporterogen in 3'-Richtung von der Verpackungssequenz in der ehemaligen E1-Region. Im rekombinanten Adenovirus Ad-micLuc steuert der Herzmuskel-spezifische „myosin-light-chain“-2v (mlc-2v) Promotor, in Ad-rsvLuc der „Rous Sarcoma Virus“ (rsv) Promotor die Expression des Luciferasegens. Im Adenovirus Ad-Luc wurde das Luciferasegen ohne vorgeschalteten Promotor in das adenovirale Genom integriert und diente so als Negativkontrolle.

#### Expression des Transgens in den etablierten Zelllinien HeLa, H9c2 und A10 sowie in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte nach Infektion mit rekombinanten Adenoviren

Die Luciferaseaktivität wurde in HeLa- (humanes Zervixkarzinom), H9c2- (Ratte, Herzmuskelblast), A10- (Ratte Aorta) Zellen und in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte nach Infektion mit den rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-micLuc bestimmt. Infektion erfolgte unter Standardbedingungen mit einer „multiplicity of infection“ (m.o.i.) von 10. Achtundvierzig Stunden nach der Infektion wurde die Luciferaseaktivität in den Zellen bestimmt. In neonatalen Rattenkardiomyozyten wurde im Vergleich zu den etablierten Zelllinien HeLa, H9c2 und A10 die höchste Luciferaseaktivität nach Injektion von Ad-Luc gemessen. In Lysaten Ad-rsvLuc (Positivkontrolle) infizierter neonataler Kardiomyozyten wurde insgesamt die höchste Luciferaseaktivität, (in „Relative Light Units“ (RLU) pro µg Protein) gefunden, wobei sich die Ergebnisse für die verschiedenen Zelllinien kaum unterschieden. In HeLa-, H9c2- und A10-Zellen war die Luciferaseaktivität von Ad-micLuc vergleichbar mit der der Negativkontrolle Ad-Luc; Dahingegen war sie in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte für Ad-micLuc um den Faktor 21 höher als die für Ad-Luc und erreichte hier 8 % der durch Ad-rsvLuc induzierten Luciferaseaktivität.

#### Expression des Transgens nach Injektion von rekombinanten Adenoviren in die Herzkammer von neonatalen Ratten

Um die Herzmuskel-spezifische Aktivität des rekombinanten Adenovirus Ad-micLuc zu untersuchen, wurden jeweils 20 µl (=  $2 \times 10^9$  „plaque forming units“ (p.f.u.)) der rekombinanten Adenoviren direkt in die Herzkammer neonataler Ratten injiziert. In gleicher Weise wurden auch als Positivkontrolle Ad-rsvLuc und als Negativkontrolle Ad-Luc injiziert. Fünf Tage nach der Injektion wurde die Luciferaseaktivität in 12 verschiedenen Geweben (Interkostalmuskel, Herz, Thymus, Lunge, Diaphragma, Bauchmuskel, Leber, Magen, Milz, Niere, Gehirn und Quadriceps femoris) bestimmt. Die ermittelte Luciferaseaktivität in RLU/mg Gewebe wird in Abbildung 2 zusammengefaßt. Adenovirus Ad-micLuc, der den Herzmuskel-spezifischen mlc-2v Promotor trägt, zeigte eine Luciferaseaktivität, die auf den Herzmuskel beschränkt blieb (Abbildung 2a). Die Injektion der Positivkontrolle Ad-rsvLuc zeigte die höchste Luciferaseaktivität im Interkostalmuskel, im Herzen und eine starke Luciferaseaktivität in Lunge, Thymus und Diaphragma (Abbildung 2b). Im Ad-Luc injizierten Tier wurde eine geringe Luciferaseaktivität im Interkostalmuskel, Herz, Thymus und Diaphragma gemessen (Abbildung 2c). Im Herzen war die Ad-micLuc induzierte Luciferaseaktivität 17 mal höher als die von Ad-Luc, während in allen anderen Geweben die Luciferaseaktivität von Ad-Luc und Ad-micLuc vergleichbar stark war. Damit wurde gezeigt, daß Ad-micLuc spezifisch im Herzen aktiv ist. Im Vergleich zu Ad-rsvLuc erreichte Ad-micLuc 9 % der RSV-Promotoraktivität im Herzen. Die Verteilung infizierter Herzmuskelzellen nach Injektion von Adenoviren in die Herzkammer neonataler Ratten wurde in Vorexperimenten durch die Injektion des rekombinanten Adenovirus Ad-rsvβgal zusätzlich überprüft. Das rekombinante Adenovirus Ad-rsvβgal exprimiert die β-Galaktosidase als Reporterogen unter Kontrolle des „Rous Sarcoma Virus“ (rsv) Promotors. Fünf Tage nach der Injektion erfolgte die Sektion des

01-10-96 21:59

Dr. Wolfgang-M. Franz

49-4509-1002

S04

Tieres und die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase wurde nach Färbung des Transgens bestimmt. In den histologischen Schnitten sind infizierte Zellen durch Blaufärbung des Kerns zu erkennen. Etwa die Hälfte der myokardialen  $\beta$ -Galaktoseaktivität zeigte sich im Bereich der Einstichstelle in die Herzkammer. Entlang des Kanals der Injektionsnadel fand sich in fast allen Kardiomyozyten  $\beta$ -Galaktoseaktivität (Abbildung 3a), wohingegen im restlichen Myokard die Anzahl infizierter Kardiomyozyten gering war (Abbildung 3b).

#### Expression des Transgens nach Injektion von rekombinanten Adenoviren in die Oberschenkelmuskulatur neonataler Ratten

Um die Aktivität des mlc-2v Promotors im Skelettmuskel zu untersuchen, wurden 20  $\mu$ l mit  $2 \times 10^9$  „plaque forming units“ (p.f.u.) der drei rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc in den rechten Oberschenkelmuskel Quadriceps femoris neonataler Ratten injiziert. Fünf Tage nach der Injektion wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. Ad-Luc und Ad-mlcLuc zeigten vergleichbar geringe Luciferaseaktivitäten (RLU/mg Gewebe) im injizierten Muskel, während Ad-rsvLuc sehr stark aktiv war (Tabelle 1). Die Luciferaseaktivität, erzielt durch Ad-mlcLuc, betrug 0.05 % von Ad-rsvLuc. Diese Daten zeigen, daß Ad-mlcLuc im Skelettmuskel nicht aktiv ist und bestätigen die Herzmuskel-spezifische Genexpression durch den rekombinanten Adenovirus Ad-mlcLuc.

#### Nachweis adenoviraler DNA in Geweben nach Injektion rekombinanter Adenoviren in die Herzkammer

Um das Ausmaß der Infektion von Nicht-Herzgewebe nach Injektion der rekombinanten Adenoviren in die Herzkammer zu bestimmen, wurde die genomische DNA aus 12 Geweben isoliert (Interkostalmuskel, Herz, Thymus, Lunge, Diaphragma, Bauchmuskel, Leber, Magen, Milz, Niere, Gehirn, Quadriceps femoris) und die Präsenz der adenoviralen DNA in diesen Geweben durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) bestimmt. Es wurden die Gewebe von jeweils zwei mit Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc infizierten Tieren untersucht. In Vorexperimenten wurde die Sensitivität des Nachweises adenoviraler DNA bestimmt, indem 100 ng genomischer DNA von nicht infizierten Ratten mit abnehmenden Mengen adenoviraler DNA Ad del 324 (von 10 pg bis 0.1 fg) vermischt und anschließend mittels PCR untersucht wurden. Hierbei zeigte sich, daß 10 fg der adenoviralen DNA Ad del 324 in 100 ng genomischer DNA nicht infizierter Tiere noch nachgewiesen werden konnten. Dies entspricht 0.017 adenoviralen Genomen pro Zelle (Abbildung 4a). In mit Adenovirus infizierten Tieren wurde die virale DNA regelmäßig im Interkostalmuskel, Herz, Thymus, Lunge, Diaphragma und Leber nachgewiesen (Abbildung 4b zeigt drei repräsentative Tiere). Um die Sensitivität des Nachweises der adenoviralen DNA zu steigern, wurden die PCR-Produkte auf eine Nylon-Membran überführt und durch Southernblot Hybridisierung nachgewiesen. Dies zeigte, daß die adenovirale DNA in geringeren Mengen auch in den anderen Geweben nachgewiesen werden kann, mit geringen Unterschieden zwischen den einzelnen Tieren. In Abbildung 4c wird ein repräsentativer Southernblot für ein Ad-mlcLuc injiziertes Tier gezeigt.

Die beschriebenen Experimente zeigen, daß die Genexpression des rekombinanten Adenovirus Ad-mlcLuc auf den Herzmuskel-spezifischen mlc-2v Promotor und nicht auf eine lokal erhöhte Viruskonzentration zurückzuführen ist.

#### Diskussion

Wir beschreiben einen neuen adenoviralen "Shuttle"-Vektor, Ad-mlcLuc, der erstmals die ausschließliche Expression eines Transgens in Kardiomyozyten erlaubt. Dies wird durch den Herzmuskel-spezifischen mlc-2v Promotor erreicht, der im rekombinanten Adenovirus Ad-

01-10-96 21:59

Dr. Wolfgang-M. Franz

+49-4505-7062

S65

mlcLuc das Transgen exprimiert (18, 30). Die spezifische Genexpression durch Ad-mlcLuc wurde in neonatalen Kardiomyozyten *in vitro* und im Herzmuskel *in vivo* gezeigt. Mit der Negativkontrolle Ad-Luc wurde nach identischen Injektionsbedingungen die höchste Luciferaseaktivität in neonatalen Kardiomyozyten bestimmt; diese war achtmal höher als in H9c2 Zellen, zwanzigmal höher als in HeLa Zellen und siebenmal höher als in A10 Zellen. Diese höhere Luciferaseaktivität in neonatalen Kardiomyozyten könnte durch die bessere Infizierbarkeit dieser Zellen durch die Adenoviren erklärt werden.

Die Injektion der rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-mlcLuc und Ad-rsvLuc in die Herzkammer der neonatalen Ratten zeigte die Herzmuskel-spezifische Genexpression von Ad-mlcLuc *in vivo*. Im Herzmuskel Ad-mlcLuc infizierter Tiere wurde eine 17-fach höhere Luciferaseaktivität bestimmt als für die Negativkontrolle Ad-Luc. Im Vergleich zu Ad-rsvLuc erreichte Ad-mlcLuc 9 % der Luciferaseaktivität im Herzmuskel. Damit sind die relativen Luciferaseaktivitäten der Viren in neonatalen Kardiomyozyten *in vitro* und im neonatalen Herzen *in vivo* sehr gut vergleichbar. In den 11 weiteren untersuchten Geweben (Interkostalmuskel, Thymus, Lunge, Diaphragma, Bauchmuskel, Leber, Magen, Milz, Niere, Gehirn, Quadriceps femoris) lag die Luciferaseaktivität nach Injektion von Ad-mlcLuc nicht über der nach Injektion der promotorlosen Kontrolle Ad-Luc. Anzumerken ist, daß in Herz, Diaphragma und Interkostalmuskel nach Injektion von Ad-Luc eine geringe Luciferaseaktivität nachweisbar war. Diese Basisaktivität könnte möglicherweise auf einer kryptischen Promotoraktivität viraler DNA-Sequenzen beruhen.

Im Gegensatz zu Ad-mlcLuc konnte nach Injektion von Ad-rsvLuc in Interkostalmuskel, Thymus, Lunge und Diaphragma eine hohe Luciferaseexpression nachgewiesen werden. Die Luciferaseexpression in diesen Geweben wurde auch nach intrakavitärer Injektion eines adenoviralen Vektors beobachtet, bei dem der Cytomegalievirus (CMV)-Promotor die Luciferaseexpression antreibt (16).

Um ein zusätzliches Kriterium für die Spezifität der Luciferaseexpression zu bekommen, wurde die Präsenz der adenoviralen DNA in den verschiedenen Geweben durch PCR bestimmt. Die adenovirale DNA wurde nach intrakavitärer Injektion der Viren im Interkostalmuskel, Herzen, Thymus, in der Lunge, im Diaphragma und in der Leber nachgewiesen. Mit Ausnahme der Leber sind dies dieselben Gewebe, in denen auch die Luciferaseexpression nach Injektion von Ad-rsvLuc nachgewiesen wurde. Die Abwesenheit der Luciferaseaktivität in der Leber, trotz des Nachweises adenoviraler DNA in diesem Gewebe, könnte an der geringeren RSV-Promotoraktivität in der Leber liegen. Im transgenen Mausmodell wurde gezeigt, daß der RSV-Promotor in der Leber weitgehend inaktiv ist (20). Damit korreliert die durch PCR nachweisbare adenovirale DNA sehr gut mit der Luciferaseaktivität in Ad-rsvLuc injizierten Tieren. Im Gegensatz zu Ad-rsvLuc blieb im Ad-mlcLuc injizierten Tier die Luciferaseaktivität auf das Herz beschränkt, obwohl die adenovirale DNA deutlich in anderen Geweben nachgewiesen wurde. Folglich kann durch das rekombinante Adenovirus Ad-mlcLuc eine Herzmuskel-spezifische Genexpression gewährleistet werden. Die Herzmuskel-spezifische Expression von Ad-mlcLuc wurde durch die Ergebnisse der Injektion der rekombinanten Viren in den Oberschenkelmuskel der neonatalen Ratten bestätigt. Während Ad-mlcLuc und Ad-Luc vergleichbar niedrige Luciferaseaktivitäten zeigten, nachdem sie direkt in den Oberschenkel der neonatalen Ratte injiziert wurden, war Ad-rsvLuc sehr stark aktiv. Ad-Luc und Ad-mlcLuc erreichten im injizierten Skelettmuskel lediglich 0,05 % der Luciferaseaktivität von Ad-rsvLuc.

Die Fähigkeit, die rekombinante Genexpression so zu programmieren, daß sie auf das Myokard beschränkt bleibt, könnte für die Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen nützlich sein. So könnte beispielsweise bei Patienten mit X-chromosomaler Kardiomyopathie auf der Basis eines defekten Dystrophinproteins die Expression des Dystrophingens im Herzmuskel zu einer signifikanten Verbesserung der Kardiomyopathie führen (3). In früheren Versuchen mit adenoviralen Vektoren konnte keine auf Kardiomyozyten beschränkte Genexpression gewährleistet werden (4, 16, 17). Nach Applikation der Adenoviren wurde die Expression des Transgens in verschiedenen Nicht-Kardiomyozyten beobachtet. Nebenwirkungen aufgrund einer unerwünschten Expression des Transgens in Nicht-Zielzellen führen zu begründeten Sicherheitsbedenken. S verurteilte die intrakardiale Injektion d s rekombinanten

## Beschreibung

### Herzmuskel-spezifische Genexpression durch replikationsdefiziente rekombinante Adenoviren

#### Abstrakt

Rekombinante Adenoviren sind vielversprechende „Shuttle“-Vektoren für eine zukünftige Gentherapie von Herzmuskelerkrankungen. Ihre Fähigkeit verschiedene Zelltypen zu infizieren, kann jedoch zur Expression von vermeintlich therapeutischen Genen außerhalb des Herzmuskels und damit zu unerwünschten Risiken führen. Um die Genexpression auf Kardiomyozyten zu beschränken, wurde ein rekombinantes Adenovirus (Ad-mlcLuc) konstruiert, in dem der Herzmuskel-spezifische „myosin light chain“-2v (mlc-2v Promotor der Ratte die Transkription eines Luciferase-Reportergens reguliert. Als Kontrollen wurden die entsprechenden adenoviralen Konstrukte ohne Promotor (Ad-Luc) und mit dem „Rous Sarkoma Virus“ (RSV) (rsv) Promotor (Ad-rsvLuc) erstellt. Unsere Daten zeigen, daß der neue virale Vektor Ad-mlcLuc *in vitro* spezifisch in primären Rattenkardiomyozyten, nicht jedoch in drei etablierten Zelllinien (HeLa, H9c2 und A10) aktiv war. Durch die Injektion der rekombinanten Adenoviren in die Herzkammer von neonatalen Ratten wurde die Herzmuskel-spezifische Genexpression von Ad-mlcLuc *in vivo* bewiesen, obwohl unterschiedliche Mengen adenoviraler DNA durch PCR-Analysen in allen untersuchten Geweben der infizierten Tiere nachweisbar waren. *In vitro* und *in vivo* war der mlc-2v Promotor spezifisch in Herzmuskelzellen aktiv, und erreichte dort 8-9 % der Luciferaseaktivität des rsv-Promotors. Die direkte Injektion von Ad-mlcLuc in den Oberschenkelmuskel neonataler Ratten ergab nur eine Hintergrundaktivität für Luciferase von etwa 0.05 % im Vergleich zu Ad-rsvLuc. Im adenoviralen „Shuttle“-Vektor-System ermöglicht der mlc-2v Promotor die Herzmuskel-spezifische Genexpression eines Fremdgens und ist daher ein nützliches Vehikel für einen gerichteten Gentransfer in das Herz.

**Schlüsselwörter:** Adenovirus, Herzmuskel, Myosin Leichtkette-2v Promotor, Genexpression

#### Einleitung

Der neu etablierte adenovirale Vektor Ad-mlcLuc ist *in vitro* spezifisch in Herzmuskelzellen neonataler Ratten aktiv. Darüberhinaus führt der „myosin light chain-2v“ (mlc-2v) Promotor *in vivo* zu einer spezifischen Luciferase-Expression im Herzen. In 11 anderen untersuchten Geweben (Interkostalmuskel, Thymus, Lunge, Diaphragma, Bauchmuskel, Leber, Magen, Milz, Niere, Gehirn und Quadriceps femoris) kam es durch den mlc-2v Promotor zu keiner Luciferase-Expression, obwohl in diesen Geweben mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Southernblot adenovirale DNA nachgewiesen werden konnte. Die direkte Injektion von Ad-mlcLuc in den Oberschenkelmuskel neonataler Ratten bestätigte, daß der mlc-2v Promotor nicht im Skelettmuskel, sondern nur im Herzmuskel aktiv ist. Adenovirale Vektoren, bei denen ein Fremdgen unter Kontrolle des mlc-2v Promotors steht, stellen somit ein nützliches Vehikel für einen gerichteten Gentransfer in das Herz dar.

#### Ergebnisse

##### Konstruktion der rekombinanten Adenoviren

Zur Bestätigung der Spezifität des mlc-2v Promotors wurden drei verschiedene rekombinante Adenoviren hergestellt (siehe Abbildung 1 a-c). Die Konstruktion der replikationsdefizienten Adenoviren erfolgte durch homologe Rekombination der klonierten Plasmide pAd-mlcLuc, pAd-rsvLuc und pAd-Luc mit dem zuvor isolierten großen ClaI Fragment der del324-

Mutante des Adenovirus 5. Nach Kotransfektion in 293-Zellen wurden virale Plaques auf die korrekte Integration des Transgens untersucht und klonal auf 293-Zellen vermehrt. Die rekombinanten Adenoviren tragen das Luciferasereporter-gen in 3'-Richtung von der Verpackungssequenz in der ehemaligen E1-Region. Im rekombinanten Adenovirus Ad-mlcLuc steuert der Herzmuskel-spezifische „myosin-light-chain“-2v (mlc-2v) Promotor, in Ad-rsvLuc der „Rous Sarcoma Virus“ (rsv) Promotor die Expression des Luciferasegens. Im Adenovirus Ad-Luc wurde das Luciferasegen ohne vorgeschalteten Promotor in das adenovirale Genom integriert und diente so als Negativkontrolle.

#### **Expression des Transgens in den etablierten Zelllinien HeLa, H9c2 und A10 sowie in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte nach Infektion mit rekombinanten Adenoviren**

Die Luciferaseaktivität wurde in HeLa- (humanes Zervixkarzinom), H9c2- (Ratte, Herzmyoblast), A10- (Ratte Aorta) Zellen und in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte nach Infektion mit den rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc bestimmt. Die Infektion erfolgte unter Standardbedingungen mit einer „multiplicity of infection“ (m.o.i.) von 10. Achtundvierzig Stunden nach der Infektion wurde die Luciferaseaktivität in den Zellen bestimmt. In neonatalen Rattenkardiomyozyten wurde im Vergleich zu den etablierten Zelllinien HeLa, H9c2 und A10 die höchste Luciferaseaktivität nach Injektion von Ad-Luc gemessen. In Lysaten Ad-rsvLuc (Positivkontrolle) infizierter neonataler Kardiomyozyten wurde insgesamt die höchste Luciferaseaktivität, (in „Relative Light Units“ (RLU) pro  $\mu\text{g}$  Protein) gefunden, wobei sich die Ergebnisse für die verschiedenen Zelllinien kaum unterschieden. In HeLa-, H9c2- und A10-Zellen war die Luciferaseaktivität von Ad-mlcLuc vergleichbar mit der der Negativkontrolle Ad-Luc; Dahingegen war sie in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte für Ad-mlcLuc um den Faktor 21 höher als die für Ad-Luc und erreichte hier 8 % der durch Ad-rsvLuc induzierten Luciferaseaktivität.

#### **Expression des Transgens nach Injektion von rekombinanten Adenoviren in die Herzkammer von neonatalen Ratten**

Um die Herzmuskel-spezifische Aktivität des rekombinanten Adenovirus Ad-mlcLuc zu untersuchen, wurden jeweils 20  $\mu\text{l}$  ( $= 2 \times 10^9$  „plaque forming units“ (p.f.u.)) der rekombinanten Adenoviren direkt in die Herzkammer neonataler Ratten injiziert. In gleicher Weise wurden auch als Positivkontrolle Ad-rsvLuc und als Negativkontrolle Ad-Luc injiziert. Fünf Tage nach der Injektion wurde die Luciferaseaktivität in 12 verschiedenen Geweben (Interkostalmuskel, Herz, Thymus, Lunge, Diaphragma, Bauchmuskel, Leber, Magen, Milz, Niere, Gehirn und Quadriceps femoris) bestimmt. Die ermittelte Luciferaseaktivität in RLU/mg Gewebe wird in Abbildung 2 zusammengefaßt. Adenovirus Ad-mlcLuc, der den Herzmuskel-spezifischen mlc-2v Promotor trägt, zeigte eine Luciferaseaktivität, die auf den Herzmuskel beschränkt blieb (Abbildung 2a). Die Injektion der Positivkontrolle Ad-rsvLuc zeigte die höchste Luciferaseaktivität im Interkostalmuskel, im Herzen und eine starke Luciferaseaktivität in Lunge, Thymus und Diaphragma (Abbildung 2b). Im Ad-Luc injizierten Tier wurde eine geringe Luciferaseaktivität im Interkostalmuskel, Herz, Thymus und Diaphragma gemessen (Abbildung 2c). Im Herzen war die Ad-mlcLuc induzierte Luciferaseaktivität 17 mal höher als die von Ad-Luc, während in allen anderen Geweben die Luciferaseaktivität von Ad-Luc und Ad-mlcLuc vergleichbar stark war. Damit wurde gezeigt, daß Ad-mlcLuc spezifisch im Herzen aktiv ist. Im Vergleich zu Ad-rsvLuc erreichte Ad-mlcLuc 9 % der RSV-Promotoraktivität im Herzen. Die Verteilung infizierter Herzmuskelzellen nach Injektion von Adenoviren in die Herzkammer neonataler Ratten wurde in Vorexperimenten durch die Injektion des rekombinanten Adenovirus Ad-rsv $\beta$ gal zusätzlich überprüft. Das rekombinante Adenovirus Ad-rsv $\beta$ gal exprimiert die  $\beta$ -Galaktosidase als Reportergen unter Kontrolle des „Rous Sarcoma Virus“ (rsv) Promotors. Fünf Tage nach der Injektion erfolgte die Sektion des

-6-

Tieres und die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase wurde nach Färbung des Transgens bestimmt. In den histologischen Schnitten sind infizierte Zellen durch Blaufärbung des Kerns zu erkennen. Etwa die Hälfte der myokardialen  $\beta$ -Galaktoseaktivität zeigte sich im Bereich der Einstichstelle in die Herzkammer. Entlang des Kanals der Injektionsnadel fand sich in fast allen Kardiomyozyten  $\beta$ -Galaktoseaktivität (Abbildung 3a), wohingegen im restlichen Myokard die Anzahl infizierter Kardiomyozyten gering war (Abbildung 3b).

### **Expression des Transgens nach Injektion von rekombinanten Adenoviren in die Oberschenkelmuskulatur neonataler Ratten**

Um die Aktivität des *mlc-2v* Promotors im Skelettmuskel zu untersuchen, wurden 20  $\mu$ l mit  $2 \times 10^9$  „plaque forming units“ (p.f.u.) der drei rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-*mlc*Luc in den rechten Oberschenkelmuskel Quadriceps femoris neonataler Ratten injiziert. Fünf Tage nach der Injektion wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. Ad-Luc und Ad-*mlc*Luc zeigten vergleichbar geringe Luciferaseaktivitäten (RLU/mg Gewebe) im injizierten Muskel, während Ad-rsvLuc sehr stark aktiv war (Tabelle 1). Die Luciferaseaktivität, erzielt durch Ad-*mlc*Luc, betrug 0.05 % von Ad-rsvLuc. Diese Daten zeigen, daß Ad-*mlc*Luc im Skelettmuskel nicht aktiv ist und bestätigen die Herzmuskel-spezifische Genexpression durch den rekombinanten Adenovirus Ad-*mlc*Luc.

### **Nachweis adenoviraler DNA in Geweben nach Injektion rekombinanter Adenoviren in die Herzkammer**

Um das Ausmaß der Infektion von Nicht-Herzgewebe nach Injektion der rekombinanten Adenoviren in die Herzkammer zu bestimmen, wurde die genomische DNA aus 12 Geweben isoliert (Interkostalmuskel, Herz, Thymus, Lunge, Diaphragma, Bauchmuskel, Leber, Magen, Milz, Niere, Gehirn, Quadriceps femoris) und die Präsenz der adenoviralen DNA in diesen Geweben durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) bestimmt. Es wurden die Gewebe von jeweils zwei mit Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-*mlc*Luc infizierten Tieren untersucht. In Vorexperimenten wurde die Sensitivität des Nachweises adenoviraler DNA bestimmt, indem 100 ng genomischer DNA von nicht infizierten Ratten mit abnehmenden Mengen adenoviraler DNA Ad-del324 (von 10 pg bis 0.1 fg) vermischt und anschließend mittels PCR untersucht wurden. Hierbei zeigte sich, daß 10 fg der adenoviralen DNA Ad-del324 in 100 ng genomischer DNA nicht infizierter Tiere noch nachgewiesen werden konnten. Dies entspricht 0.017 adenoviralen Genomen pro Zelle (Abbildung 4a). In mit Adenovirus infizierten Tieren wurde die virale DNA regelmäßig im Interkostalmuskel, Herz, Thymus, Lunge, Diaphragma und Leber nachgewiesen (Abbildung 4b zeigt drei repräsentative Tiere). Um die Sensitivität des Nachweises der adenoviralen DNA zu steigern, wurden die PCR-Produkte auf eine Nylon-Membran überführt und durch Southernblot Hybridisierung nachgewiesen. Dies zeigte, daß die adenovirale DNA in geringeren Mengen auch in den anderen Geweben nachgewiesen werden kann, mit geringen Unterschieden zwischen den einzelnen Tieren. In Abbildung 4c wird ein repräsentativer Southernblot für ein Ad-*mlc*Luc injiziertes Tier gezeigt.

Die beschriebenen Experimente zeigen, daß die Genexpression des rekombinanten Adenovirus Ad-*mlc*Luc auf den Herzmuskel-spezifischen *mlc-2v* Promotor und nicht auf eine lokal erhöhte Viruskonzentration zurückzuführen ist.

### **Diskussion**

Wir beschreiben einen neuen adenoviralen "Shuttle"-Vektor, Ad-*mlc*Luc, der erstmals die ausschließliche Expression eines Transgens in Kardiomyozyten erlaubt. Dies wird durch den Herzmuskel-spezifischen *mlc-2v* Promotor erreicht, der im rekombinanten Adenovirus Ad-

- 7 -

mlcLuc das Transgen exprimiert (18, 30). Die spezifische Genexpression durch Ad-mlcLuc wurde in neonatalen Kardiomyozyten *in vitro* und im Herzmuskel *in vivo* gezeigt.

Mit der Negativkontrolle Ad-Luc wurde nach identischen Injektionsbedingungen die höchste Luciferaseaktivität in neonatalen Kardiomyozyten bestimmt; diese war achtmal höher als in H9c2 Zellen, zwanzigmal höher als in HeLa Zellen und siebenmal höher als in A10 Zellen. Diese höhere Luciferaseaktivität in neonatalen Kardiomyozyten könnte durch die bessere Infizierbarkeit dieser Zellen durch die Adenoviren erklärt werden.

Die Injektion der rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-mlcLuc und Ad-rsvLuc in die Herzkammer der neonatalen Ratten zeigte die Herzmuskel-spezifische Genexpression von Ad-mlcLuc *in vivo*. Im Herzmuskel Ad-mlcLuc infizierter Tiere wurde eine 17-fach höhere Luciferaseaktivität bestimmt als für die Negativkontrolle Ad-Luc. Im Vergleich zu Ad-rsvLuc erreichte Ad-mlcLuc 9 % der Luciferaseaktivität im Herzmuskel. Damit sind die relativen Luciferaseaktivitäten der Viren in neonatalen Kardiomyozyten *in vitro* und im neonatalen Herzen *in vivo* sehr gut vergleichbar. In den 11 weiteren untersuchten Geweben (Interkostalmuskel, Thymus, Lunge, Diaphragma, Bauchmuskel, Leber, Magen, Milz, Niere, Gehirn, Quadriceps femoris) lag die Luciferaseaktivität nach Injektion von Ad-mlcLuc nicht über der nach Injektion der promotorlosen Kontrolle Ad-Luc. Anzumerken ist, daß in Herz, Diaphragma und Interkostalmuskel nach Injektion von Ad-Luc eine geringe Luciferaseaktivität nachweisbar war. Diese Basisaktivität könnte möglicherweise auf einer kryptischen Promotoraktivität viraler DNA-Sequenzen beruhen.

Im Gegensatz zu Ad-mlcLuc konnte nach Injektion von Ad-rsvLuc in Interkostalmuskel, Thymus, Lunge und Diaphragma eine hohe Luciferaseexpression nachgewiesen werden. Die Luciferaseexpression in diesen Geweben wurde auch nach intrakavitärer Injektion eines adenoviralen Vektors beobachtet, bei dem der Cytomegalievirus (CMV)-Promotor die Luciferaseexpression antreibt (16).

Um ein zusätzliches Kriterium für die Spezifität der Luciferaseexpression zu bekommen, wurde die Präsenz der adenoviralen DNA in den verschiedenen Geweben durch PCR bestimmt. Die adenovirale DNA wurde nach intrakavitärer Injektion der Viren im Interkostalmuskel, Herzen, Thymus, in der Lunge, im Diaphragma und in der Leber nachgewiesen. Mit Ausnahme der Leber sind dies dieselben Gewebe, in denen auch die Luciferaseexpression nach Injektion von Ad-rsvLuc nachgewiesen wurde. Die Abwesenheit der Luciferaseaktivität in der Leber, trotz des Nachweises adenoviraler DNA in diesem Gewebe, könnte an der geringeren RSV-Promotoraktivität in der Leber liegen. Im transgenen Mausmodell wurde gezeigt, daß der RSV-Promotor in der Leber weitgehend inaktiv ist (20). Damit korreliert die durch PCR nachweisbare adenovirale DNA sehr gut mit der Luciferaseaktivität in Ad-rsvLuc injizierten Tieren. Im Gegensatz zu Ad-rsvLuc blieb im Ad-mlcLuc injizierten Tier die Luciferaseaktivität auf das Herz beschränkt, obwohl die adenovirale DNA deutlich in anderen Geweben nachgewiesen wurde. Folglich kann durch das rekombinante Adenovirus Ad-mlcLuc eine Herzmuskel-spezifische Genexpression gewährleistet werden. Die Herzmuskel-spezifische Expression von Ad-mlcLuc wurde durch die Ergebnisse der Injektion der rekombinanten Viren in den Oberschenkelmuskel der neonatalen Ratten bestätigt. Während Ad-mlcLuc und Ad-Luc vergleichbar niedrige Luciferaseaktivitäten zeigten, nachdem sie direkt in den Oberschenkel der neonatalen Ratte injiziert wurden, war Ad-rsvLuc sehr stark aktiv. Ad-Luc und Ad-mlcLuc erreichten im injizierten Skelettmuskel lediglich 0,05 % der Luciferaseaktivität von Ad-rsvLuc.

Die Fähigkeit, die rekombinante Genexpression so zu programmieren, daß sie auf das Myokard beschränkt bleibt, könnte für die Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen nützlich sein. So könnte beispielsweise bei Patienten mit X-chromosomaler Kardiomyopathie auf der Basis eines defekten Dystrophinproteins die Expression des Dystrophingens im Herzmuskel zu einer signifikanten Verbesserung der Kardiomyopathie führen (3). In früheren Versuchen mit adenoviralen Vektoren konnte keine auf Kardiomyozyten beschränkte Genexpression gewährleistet werden (4, 16, 17). Nach Applikation der Adenoviren wurde die Expression des Transgens in verschiedenen Nicht-Kardiomyozyten beobachtet. Nebenwirkungen aufgrund einer unerwünschten Expression des Transgens in Nicht-Zielzellen führen zu begründeten Sicherheitsbedenken. So verursachte die intrakardiale Injektion des rekombinanten

Adenovirus AdShK beispielsweise eine starke Expression des Drosophila Shaker Kaliumkanals in der Leber. Wie die Autoren mitteilten, könnte dies phänotypisch insofern erhebliche Konsequenzen haben, als das Membranpotential der Hepatozyten für die zelluläre Aufnahme von Gallensäuren verantwortlich ist (37). Durch den Einsatz des neuen adenoviralen Vektors Ad-mlcLuc, der eine Herzmuskel-spezifische Genexpression ermöglicht, könnten derartige Nebenwirkungen auf nicht-kardiale Zielzellen vermieden werden.

Da der rekombinante Adenovirus Ad-mlcLuc ein Vektor erster Generation ist, ist die Genexpression zeitlich auf einige Wochen begrenzt. Dies könnte in manchen Fällen vorteilhaft sein, in anderen Fällen wäre jedoch möglicherweise einer länger anhaltende Expression wünschenswert. Die derzeit noch begrenzte Dauer der Expression des Transgens könnte künftig durch die Herstellung adenoviraler Vektoren der zweiten und dritten Generation überwunden werden. Eine Kombination aus dem gewebespezifischen mlc-2v Promotors und adenoviralen Vektoren der zweiten und dritten Generation könnte zu rekombinanten Adenoviren führen, die eine lang anhaltende und Herzmuskel-spezifische Genexpression erlauben und sich so zur Therapie von Herzmuskelerkrankungen, wie der dilativen oder hypertrophen Kardiomyopathie eignen.

## Material und Methoden

### Konstruktion der rekombinanten Plasmide pAd-Luc, pAd-rsvLuc und pAd-mlcLuc

Die Plasmide pAd-Luc, pAd-rsvLuc und pAd-mlcLuc sind Derivate des Plasmids pAd.RSV- $\beta$ gal, in dem die BamHI-KpnI RSV- $\beta$ gal („Rous Sarcoma Virus“-Promotor und  $\beta$ -Galaktosidase Reportergen)-Kassette gegen die Luciferase cDNA mit ihrem endogenen Polyadenylierungssignal ausgetauscht ist (15). Hierfür wurde das HindIII/KpnI Fragment des Plasmids pSVOAL 5', welches für das Luciferasegen kodiert, in die HindIII/KpnI Klonierungsschnittstellen des Vektors pBluescriptSK (Stratagene) subkloniert und dadurch das Plasmid pBluescript-Luc erzeugt (27). Das BamHI/KpnI Luciferase Fragment des Subklons pBluescript-Luc wurde anschließend in die BamHI/KpnI Schnittstellen des Plasmids pAd.RSV- $\beta$ gal kloniert und dadurch das Plasmid pAd-Luc erzeugt. Für die Klonierung des Plasmids pAd-rsvLuc wurde das BamHI/HindIII RSV-Fragment (587 bp) des Plasmids pAd.RSV- $\beta$ gal in die BamHI/HindIII Schnittstellen des Subklons pBluescript-Luc kloniert und dadurch das Plasmid pBluescript-rsvLuc erzeugt. Anschließend wurde das BamHI/KpnI RSV-Luciferase-Fragment des Plasmids pBluescript-rsvLuc in die BamHI/KpnI Schnittstellen von pAd.RSV- $\beta$ gal kloniert und dadurch das Plasmid pAd-rsvLuc erzeugt. Für die Herstellung des Plasmids pAd-mlcLuc wurde das BamHI/KpnI mlc-Luciferase-Fragment (ca. 0.8 kb „myosin light chain“-2v-Promotor und 1.8 kb Luciferasegen) aus Plasmid pMLCL 5" direkt in die BamHI/KpnI Schnittstellen des Plasmids pAd-RSV $\beta$ gal kloniert (30).

### Konstruktion der rekombinanten Adenoviren

Die rekombinanten Adenoviren wurden durch homologe Rekombination zwischen den Plasmiden pAd-Luc, pAd-rsvLuc und pAd-mlcLuc und der genomischen DNA von Adenovirus del324 (Ad5) in 293-Zellen erzeugt (15, 26). Am Tag vor der Transfektion wurden  $2 \times 10^6$  293-Zellen in eine kleine Zellkulturschale ausplattiert. Fünf  $\mu$ g des großen ClaI-Fragments der genomischen DNA von Ad5 wurden zusammen mit 5  $\mu$ g der AatII linearisierten Plasmide pAdLuc, pAd-rsvLuc und pAd-mlcLuc nach der Kalziumphosphatmethode in 293-Zellen kotransfiziert. Nach Überschichten mit Weichagar (1 % SeaPlaque Agarose, 1x MEM, 2 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 0.1  $\mu$ g/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin) und 8-10 Tagen Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden virale Plaques

ausgestanzt und auf 293-Zellen klonal vermehrt. Aus  $2 \times 10^6$  vollständig infizierten 293-Zellen wurde die virale DNA der rekombinanten Viren isoliert und durch hydraulischen Verdau mit Restriktionsendonukleasen auf die korrekte Integration des Transgens untersucht. Von den positiven viralen Klonen wurde ein erneut eine Einzelplaquereinigung durchgeführt bevor sie in 293-Zellen für eine Großaufarbeitung vermehrt und durch zweimalige Caesium-Chlorid-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt wurden (15). Schließlich wurden die Viren gegen TD-Puffer (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM Mg  $\text{Cl}_2$ , 10 % (v/v) Glycerol, 25 mM Tris-HCl pH 7.4) dialysiert und bei  $-72^\circ\text{C}$  eingefroren. Zur Bestimmung der Titer der präparierten Adenoviren wurde der „Plaque Assay“ unter Verwendung von 293-Zellen durchgeführt (15). Alle rekombinanten Adenoviren hatten einen Titer von etwa  $10^{11}$  „plaque forming units“ (p.f.u.)/ml. Die DNA der viralen Stammlösungen wurde isoliert und mittels Restriktionsenzymanalyse und PCR auf die korrekte Integration des Inserts untersucht. Ferner wurden die viralen Stammlösungen mittels PCR auf den Wildtyp Ad-5 untersucht, wobei in 50 ng der adenoviralen DNA keine Kontamination nachweisbar war (38).

### **Infektion von Zellen in Gewebekultur (*in vitro*)**

Primäre neonatale Rattenkardiomyozyten wurden wie von Sen et al. 1988 beschrieben präpariert und kultiviert. A10-, H9c2- und HeLa-Zellen wurden in „Dulbecco's modified Eagle's medium“ (DMEM), 293-Zellen in MEM komplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin und 2 mM L-Glutamin kultiviert. Einen Tag vor der Infektion wurden  $2 \times 10^5$  frisch präparierte neonatale Kardiomyozyten oder  $1 \times 10^5$  Zellen der etablierten Zelllinien H9c2, A10 und HeLa in Triplika auf „12 well“ Kulturschalen ausplattiert. Die Zellen wurden in 0.2 ml des jeweiligen serumfreien Mediums, das die rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc in einer „multiplicity of infection“ (m.o.i.) von 10 enthielt inkubiert (10 Viren/Zelle). Nach 1 h Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  mit leichtem Schwänken alle 15 min wurden 2 ml des jeweiligen komplettierten Mediums zugegeben. Alle Infektionsexperimente wurden 4 bis 5 mal wiederholt.

### **Luciferase-Bestimmung**

Für die *in vitro* Studien wurden die Zellen 48 h nach der Infektion geerntet. Anschließend wurde die Luciferaseaktivität in Proteinextrakten nach etablierten Protokollen mittels Transiluminometer Lumat LB 9501 (Bertold, Wildbad) bestimmt (40). Die Proteinkonzentration der Lysate wurde nach Bradford (1976) bestimmt (BioRad, München). Die Luciferaseaktivität wurde in pg Luciferase pro  $\mu\text{g}$  Protein umgerechnet wie beschrieben (10, 18). Für die *in vivo* Studien wurden die Ratten 5 Tage nach Injektion dekapitiert. Zwölf verschiedene Gewebe (Interkostalmuskel, Herz, Thymus, Lunge, Diaphragma, Bauchmuskel, Leber, Magen, Milz, Nieren, Quadriceps femoris, Gehirn) wurden entnommen und sofort im flüssigen  $\text{N}_2$  eingefroren. Anschließend wurden die Gewebeproben gewogen, in 200  $\mu\text{l}$  Lysepuffer (1% (v/v) Triton X-100, 1 mM DTT, 100 mM Kaliumphosphat pH 7.8) aufgenommen, in einem Glashomogenisator aufgeschlossen und für 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  in einer Kälzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Luciferase-Bestimmung eingesetzt (31, 40). Die Luciferaseaktivität wurde in „relative light units“ (RLU)/mg Gewebe-Naßgewicht angegeben, nach Abzug der Hintergrundaktivität, die für die verschiedenen Gewebe in nicht-infizierten Tieren ermittelt wurde.

### ***In vivo* Injektionen in die Herzkammer und den Oberschenkelmuskel**

Alle Injektionen wurden an spezifisch pathogenfreien 2-3 Tage alten Sprague Dawley Ratten (CRWiga, Sulzfeld) durchgeführt. Vor den Injektionen wurden die neonatalen Ratten durch 3-5 min Inhalation mit Methoxyfluran (Metofane, Jann=ssen GmbH) narkotisiert.  $2 \times 10^9$  „plaque forming units“ (p.f.u.) der rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc wurden in einem Volumen von 20  $\mu$ l mittels einer Tuberkulinspritze (27,5 gauge) injiziert. Die Injektion erfolgte durch direkte Punktion der Herzkammer durch den Brustkorb lateral im 4. Interkostalraum. Durch Aspiration von Herzblut wurde sichergestellt, daß die Nadelspitze intrakavitär positioniert war. Eine langsame Injektion der Viren (20  $\mu$ l/min) wurde durch einen selbstkonstruierten Aufsatz für Tuberkulinspritzen erreicht. Die Injektion der rekombinanten Adenoviren in Quadriceps femoris wurde entsprechend durchgeführt.

### Polymerasekettenreaktion (PCR)

Parallel zu den Luciferase-Bestimmungen wurde genomische DNA aus den Sedimenten der Gewebehomogenate der mit Adenoviren infizierten neonatalen Ratten unter Verwendung des QIAamp Tissue Kit (Fa. Quiagen, Hilden) nach Herstellerangaben extrahiert. Jeweils zwei der mit Ad-Luc, Ad-rsv-Luc und Ad-mlcLuc infizierten Tiere wurden auf die Gewebeverteilung der injizierten Viren durch die PCR zum Nachweis der adenoviralen DNA untersucht wie von Zhang et al. 1995 beschrieben, mit geringen Abweichungen (38). Einhundert ng genomische DNA wurde als Probe zusammen mit 40 ng der Oligonukleotide E2B-1 und E2B-2 und 1.25 U Taq Polymerase von Promega in einem Reaktionsvolumen von 25  $\mu$ l eingesetzt (38). Gelelektrophorese des spezifischen PCR Produktes ergab eine 860 bp Bande.

Die Sensitivität der PCR wurde in Vorversuchen bestimmt. Hier wurden 100 ng genomische DNA einer nicht infizierten Ratte mit abnehmenden Mengen Ad-del324 DNA gemischt und in einer Polymerasekettenreaktion als Probe eingesetzt. Um die Sensitivität des Nachweises der PCR zu erhöhen, wurden die PCR Produkte auf eine GeneScreenPlus Nylonmembran (NEN, Boston, Massachusetts) durch Kapillarblot transferiert und anschließend durch Southernblot-Hybridisierung nachgewiesen (40). Als Sonde wurde das durch PCR amplifizierte adenovirale 860 bp DNA-Fragment der Positivkontrolle eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde aus dem Gel gereinigt und durch „random hexanucleotide prime“ mit  $^{32}$ P radioaktiv markiert und als Probe für die Hybridisierung verwendet (40). Die Sensitivität des PCR-Nachweises konnte auf diese Weise um den Faktor 10 bis 100 verbessert werden.

### $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung

Die Herzen neonataler Ratten wurden in  $N_2$  gekühltem Isopentan eingefroren und bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert. Das Herzgewebe wurde in O.C.T. (Tissue Tek, Miles, USA) Einfriermedium eingebettet und 10  $\mu$ m Gewebeschnitte mit einem Kryostat (Frigocut 2800 E, Leica) angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte 10 min in Lösung A fixiert (PBS, 0.2 % (v/v) Glutaraldehyd, 5 mM EDTA, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 3 x 10 min mit Lösung B gewaschen (PBS, 0.01 % (v/v) Na-Desoxycholat, 0.02 % (v/v) Nonidet P40, 5 mM EDTA, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ) und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  in Lösung C gefärbt (Lösung B + 1 mg/ml X-Gal, 5 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 5 mM  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ). Anschließend wurde einmal mit Lösung B und einmal mit destilliertem Wasser für 10 min gewaschen. Eine schwache Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Eosin, sowie das Dehydrieren und Einbetten der Proben erfolgte nach Standardprotokollen (41).

01.10.98

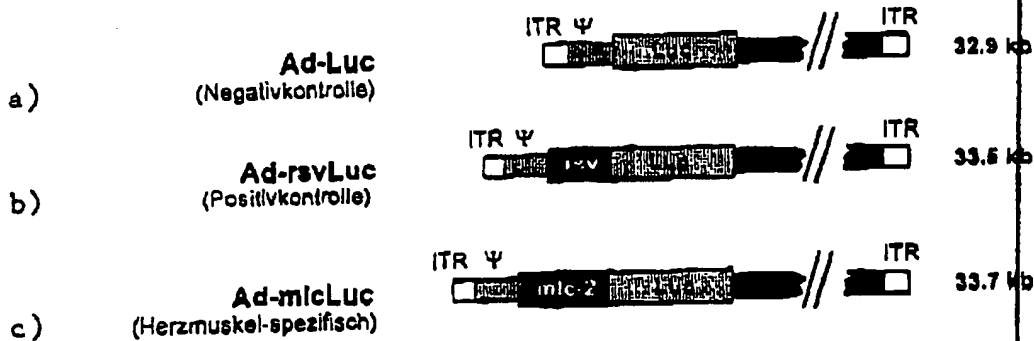


Abbildung 1: Replikationsdefiziente rekombinante Adenoviren wurden durch homologe Rekombination in 293-Zellen erzeugt. Die erhaltenen Viren stammen vom Adenovirus del324 ab, wobei das Luciferasegen in die ehemalige E1-Region kloniert wurde. Die Expression des Luciferasegens wird entweder durch keinen Promotor (Ad-Luc/Negativkontrolle) (a), den rsv Promotor (Ad-rsvLuc/Positivkontrolle) (b), oder den mlc-2v Promotor (Ad-mlcLuc/Herzmuskel-spezifisch) kontrolliert. (ITR = „Inverted Terminal Repeats“, = Verpackungssequenz, rsv = „Rous Sarkoma Virus“, mlc-2 = „myosin light chain“-2v Promotor).

04-11-02

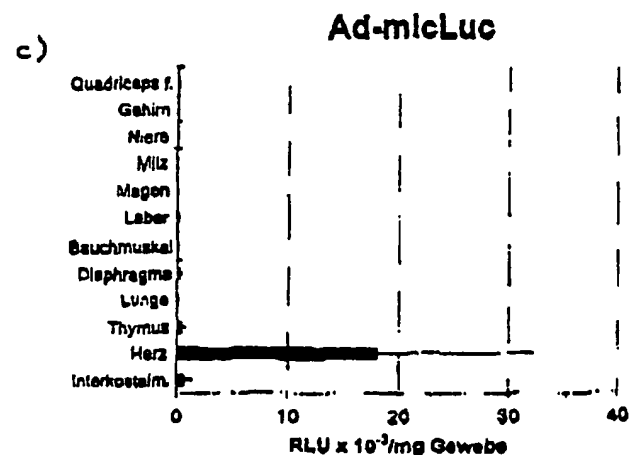
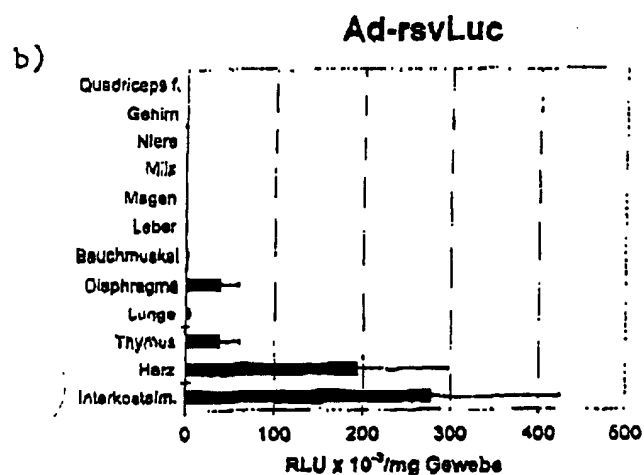
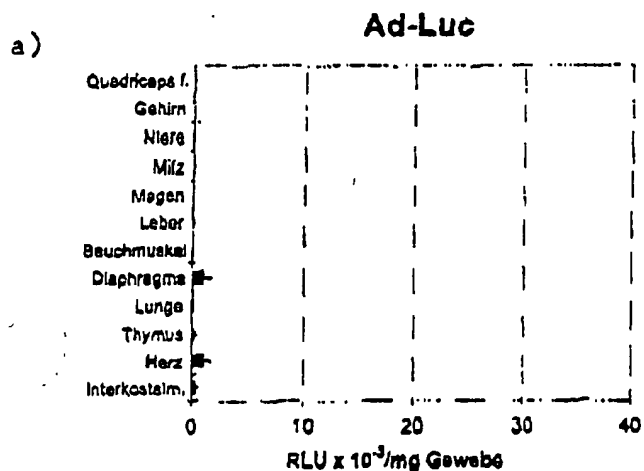


Abbildung 2.: Luciferaseaktivität in 12 verschiedenen Geweben nach Injektion der rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-micLuc.  $2 \times 10^5$  p.f.u. in einem Volumen von 20  $\mu$ l wurden in die Herzkammer neonataler Ratten injiziert. Die Gewebe wurden fünf Tage nach der Injektion analysiert. Die Luciferaseaktivität wird angegeben in „Relative Light Unit“ (RLU)/mg Geweb (Naßgewicht). Die Säulen zeigen den Mittelwert aus vier Experimenten an, der mittlere Balken gibt die Standardabweichung des Mittelwertes an. Maßstab von Ad-rsvLuc beachten.

004-97308

13

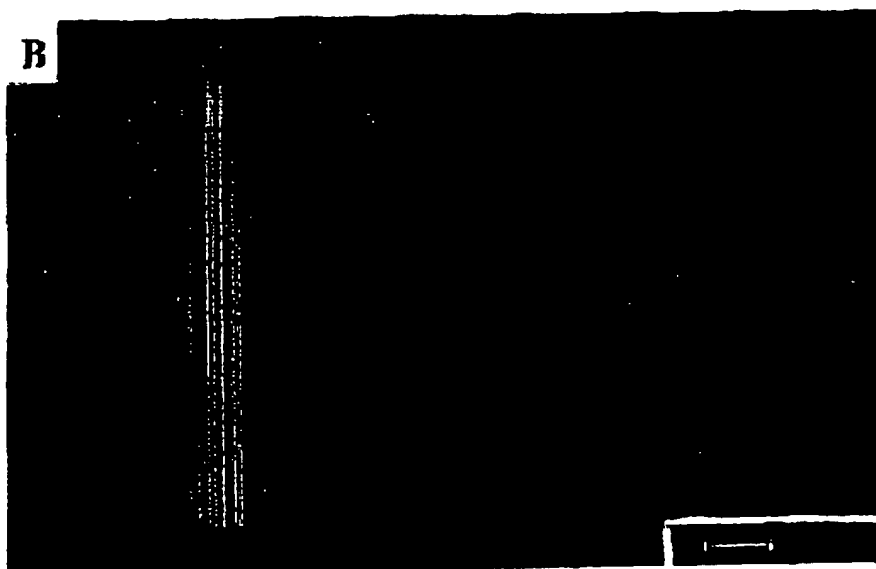


Abbildung 3 : Histologischer Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität im Myokard 5 Tage nach intrakavitärer Injektion des Adenovirus Ad.RSV $\beta$ gal. (A) Fotografie eines histologischen Schnittes durch den Apex (Injektionsstelle). (B) Fotografie eines histologischen Schnittes durch den linken Ventrikel. Blaufärbung repräsentiert  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität. Der Balken entspricht 100  $\mu$ m.

01.10.98

2

	Ad-Luc	Ad-rsvLuc	Ad-mloLuc
RLU $\times 10^3$ /mg Quadriceps f.	$3,4 \pm 1,2$	$5620 \pm 1239$	$2,8 \pm 1,8$

Tabelle 1: Luciferaseaktivität im Quadriceps f. fünf Tage nach Injektion von  $2 \times 10^9$  p.f.u. (20  $\mu$ l) der rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mloLuc in den Oberschenkel neonataler Ratten. Angegeben werden die Mittelwerte für vier Versuchstiere  $\pm$  Standardabweichung.

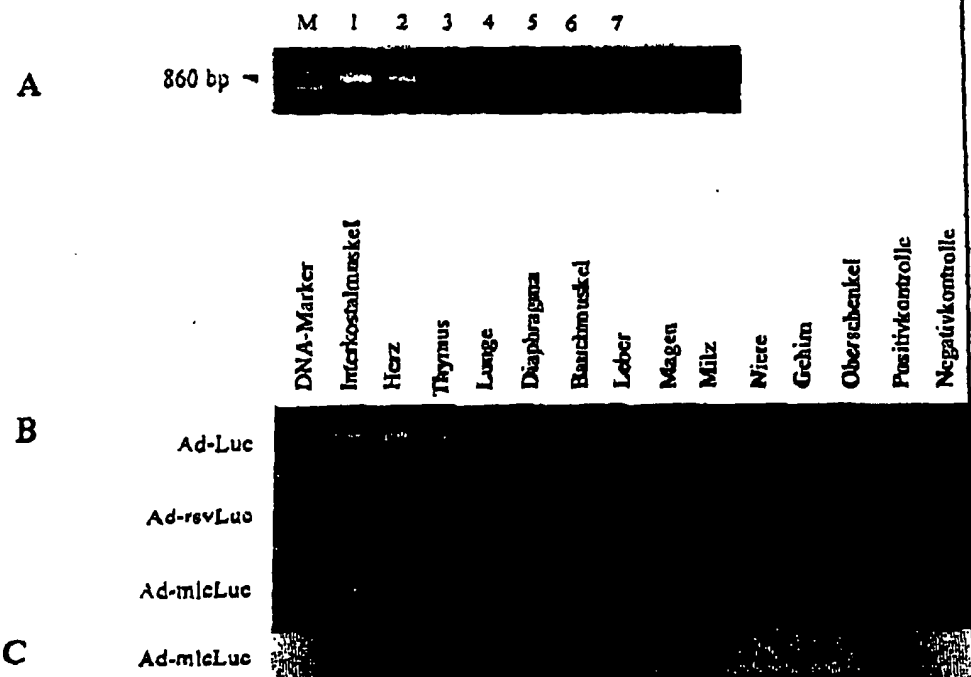


Abbildung 4 : Nachweis der adenoviralen DNA in 12 verschiedenen Geweben nach intrakavitärer Injektion der rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-micLuc. (A) Das Agarosegel (2.4%) zeigt das spezifische 860 bp PCR Produkt, das durch Amplifikation von abnehmenden Mengen Addel324 DNA erzeugt wurde. Als Probe wurden 100 ng genomische DNA der Ratte gemischt mit Addel324 DNA eingesetzt: 10 pg (Spur 1); 1 pg (Spur 2), 100 fg (Spur 3); 10 fg (Spur 4); 1 fg (Spur 5); 0.1 fg (Spur 6); keine virale DNA (Spur 7). M-DNA-Marker (100 bp Leiter). (B) Das Agarosegel (2.4%) zeigt das 860 bp PCR-Produkt, amplifiziert aus 100 ng genomischer DNA, welche aus den angegebenen Geweben nach intrakavitärer Injektion von Ad-Luc (oben), Ad-rsvLuc (mitte) und Ad-micLuc (unten) isoliert worden war. Ein PCR Ansatz mit 100 ng genomischer DNA der Ratte gemischt mit 1 pg Addel324 DNA diente als Positivkontrolle, ein Ansatz ohne Addel324 DNA als Negativkontrolle. (C) Southern Blot-Analyse des Ad-micLuc infizierten Tieres in (B). Als Sonde wurde das <sup>32</sup>P-markierte 860 bp PCR Produkt aus einem Kontrollansatz verwendet.

## References

1. [redacted] congenital heart disease in adults. In: Braunwald E (ed). *Heart Disease*. Saunders: Philadelphia, 1992; pp 1810-1826.
2. Towbin JA et al. X-linked dilated cardiomyopathy. Molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation* 1993; 87: 1854-1865.
3. Franz WM et al. X-linked dilated cardiomyopathy: novel mutation of the dystrophin gene. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 752: 470-491.
4. Kass-Eisler A et al. Quantitative determination of adenovirus-mediated gene delivery to rat cardiac myocytes *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11498-11503.
5. Guzman RJ et al. Efficient gene transfer into myocardium by direct injection of adenovirus vectors. *Circ Res* 1992; 73: 1202-1207.
6. Barr E et al. Efficient catheter-mediated gene transfer into the heart using replication defective adenovirus. *Gene Therapy* 1994; 1: 51-58.
7. Kirshenbaum LA et al. Highly efficient gene transfer into adult ventricular myocytes by recombinant adenovirus. *J Clin Invest* 1993; 92: 381-387.
8. Chunock RM et al. Immunization by selective infection with type 4 adenovirus in human diploid tissue cultures. I. Safety and lack of oncogenicity and tests for potency in volunteers. *J Am Med Assoc* 1966; 198: 443-452.
9. Yang Y et al. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenovirus for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4407-4411.
10. Krouglik V, Graham FL. Development of cell lines capable of complementing E1, E4 and protein IX defective adenovirus type 5 mutants. *Hum Gene Ther* 1993; 6: 1575-1586.
11. Wang Q, Jia XC, Finer, MH. A packaging cell line for propagation of recombinant adenovirus containing two lethal gene-region deletions. *Gene Therapy* 1995; 2: 775-783.
12. Yeh P et al. Efficient dual transcomplementation of adenovirus E1 and E4 regions from a 293-derived cell line expressing a minimal E4 functional unit. *J Virol* 1996; 70: 359-365.
13. Engelhardt JP, Ye X, Dorans B, Wilson JM. Ablation of E2s in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6196-6200.
14. Yang Y et al. Inactivation of E2s in recombinant adenoviruses improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis. *Nat Genet* 1994; 7: 362-369.
15. Stradtford-Perricaudet LD, Makeh I, Perricaudet M, Briand P. Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscles and heart. *J Clin Invest* 1992; 90: 626-630.
16. Huard J et al. The route of administration is a major determinant of the transduction efficiency of rat tissues by adenovirus recombinants. *Gene Therapy* 1995; 2: 107-115.
17. Kass-Eisler A et al. The impact of developmental stage, route of administration and the immune system on adenovirus mediated gene transfer. *Gene Therapy* 1994; 1: 395-402.
18. Franz WM et al. Heart-specific targeting of firefly luciferase by the myosin light chain-2 promoter and developmental regulation in transgenic mice. *Circ Res* 1993; 73: 629-638.
19. Lee KJ et al. Myosin light chain-2 luciferase transgenic mice reveal distinct regulatory programs for cardiac and skeletal muscle-specific expression of a single contractile protein gene. *J Biol Chem* 1992; 267: 15875-15885.
20. Lee JL, Hickey R, Zhu H, Chien KR. Positive regulatory elements (HF-1a and HF-1b) and a novel negative regulatory element (HF-3) mediate ventricular muscle-specific expression of myosin light-chain 2-luciferase fusion genes in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 1220-1229.
21. Zou Y, Chien KR. EF1A/YB-1 is a component of cardiac HF-1A binding activity and positively regulates transcription of the myosin light-chain 2v gene. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 2972-2982.
22. Yu Y-T et al. Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors. *Genes Dev* 1992; 6: 1763-1798.
23. Zhu H et al. A novel, tissue-restricted zinc finger protein (HF-1b) binds to the cardiac regulatory element (HF-1b/MEF-2) within the rat myosin light chain-2 gene. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 4432-4444.
24. Zhu H et al. A conserved 28-base-pair element (HF-1) in the rat cardiac myosin light-chain-2 gene confers cardiac-specific and alpha-adrenergic-inducible expression in cultured neonatal rat myocardial cells. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 2273-2281.
25. Overbeek PA, Lai SP, Van Quill KR, Westphal H. Tissue-specific expression in transgenic mice of a fused gene containing RSV terminal repeats. *Science* 1986; 231: 1574-1577.
26. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characterization of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; 36: 59-74.
27. Wei JR et al. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 723-737.
28. Hearing P, Shenk T. The adenovirus type 5 E1A transcriptional control region contains a duplicated enhancer element. *Cell* 1983; 33: 693-703.
29. Hearing P, Samuels RJ, Wishart WL, Shenk T. Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome. *J Virol* 1987; 61: 2555-2558.
30. Henderson SA et al. Structure, organization, and expression of the rat cardiac myosin light chain-2 gene. *J Biol Chem* 1989; 264: 1842-1848.
31. Acasadi G et al. A differential efficiency of adenovirus-mediated *in vivo* gene transfer into skeletal muscle cells of different maturity. *Hum Mol Gen* 1994; 3: 579-584.
32. Razot T et al. Efficient adenovirus-mediated transduction of

+49-4509-7002

- minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. *Nature* 1993; 361: 647-650.
- 33 Vincent N et al. Long-term correction of mouse dystrophic degeneration by adenovirus-mediated transfer of a minidystrophin gene. *Nat Genet* 1993; 3: 130-134.
- 34 Quantin B, Perricaudet LD, Tajabkhah S, Mandal JL. Adenovirus as an expression vector in muscle cells *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2581-2584.
- 35 Bessereau JL et al. *In vivo* and *in vitro* analysis of electrical activity-dependent expression of muscle acetylcholine receptor genes using adenovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1304-1308.
- 36 Jin Y et al. Effect of enhancer sequences on ventricular myosin light chain-2 promoter activity in heart muscle and nonmuscle cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; 210: 260-266.
- 37 Johns DC et al. Adenovirus-mediated expression of a voltage-gated potassium channel *in vitro* (rat cardiac myocytes) and *in vivo* (rat liver). *J Clin Invest* 1993; 94: 1152-1158.
- 38 Zhang WW, Koch PE, Roth JA. Detection of wild-type contamination in a recombinant adenoviral preparation by PCR. *BioTechniques* 1995; 18: 444-447.
- 39 Sen A et al. Terminally differentiated neonatal rat myocardial cells proliferate and maintain specific differentiated functions following expression of SV40 large T antigen. *J Biol Chem* 1988; 263: 19132-19136.
- 40 Ausbel FM et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene and Wiley; New York, 1989.
- 41 Gossler A, Zachgo J. Gene and enhancer trap screens in ES cell chimeras. In: Joyner AL (ed). *Gene Targeting*. Oxford University Press, 1993, pp 181-225.

01.10.99

25-09-96 00:15

Dr. Wolfgang-M. Franz

+49 4509 71002

S05

~~Seitengabe~~

## Weitere Erläuterung zur Erfindung

~~zu 1) Es wurde angemerkt, dass das mlc-2/Luciferase Fusionskonstrukt ungenügend~~  
~~beschrieben wurde.~~ Die Klonierung des mlc-2/Luciferase Fusionskonstrukt wurde wie  
 folgt durchgeführt: Das Plasmid pAd-mlcLuc ist ein Derivat des Plasmids pAd-  
 RSV $\beta$ gal (Stratford Perricaudet, 1992). Um Plasmid pAd-mlcLuc zu erzeugen, wurde  
 das *Bam*HI/*Kpn*I mlc-Luciferase-Fragment (ca. 0.8 kb „myosin light chain“-2v-  
 Promotor und 1.8 kb Luciferasegen) aus Plasmid pMLCL45' (Henderson, 1989) direkt  
 in die *Bam*HI/*Kpn*I Schnittstellen des Plasmids pAd-RSV $\beta$ gal kloniert. In Abbildung 1  
 wird das Plasmid schematisch dargestellt.

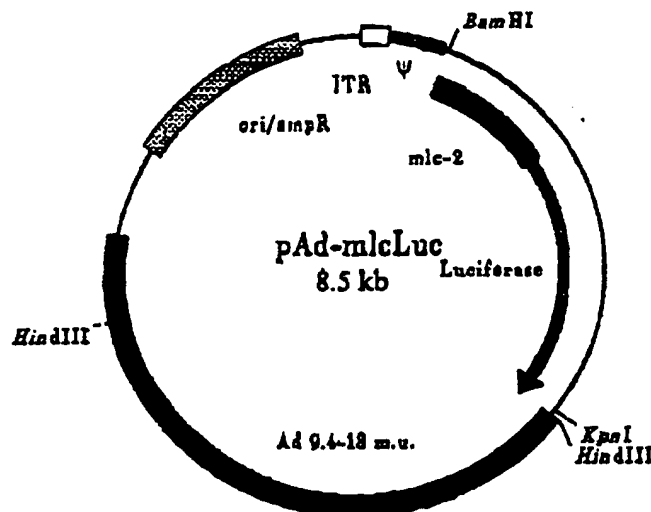


Abbildung 1: Schematische Darstellung des konstruierten Plasmids pAd-mlcLuc (8.5 kb). Die Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI, *Kpn*I und *Hind*III sind eingezeichnet (ITR = „Inverted Terminal Repeats“;  $\psi$  = Verpackungssequenz; mlc-2 = „myosin light chain“-2v-Promotor; Ad 9.4-18 m.u. = adenovirale Sequenz von 9.4 bis 18 map units von Adenovirus Typ 5; ori/ampR = „origin of replication“ / Ampicillin-Resistenzgen).

25-09-96 00:15

Dr. Wolfgang-M. Franz

01.10.96

+49-4309-71002

S96

zu 7) 1. Es wurde richtig angemerkt, daß aus den Literaturstellen D1-D3 die herzmuskelspezifische Genexpression des *mlc-2*-Promotors hervorgeht. Die herzmuskelspezifische Genexpression wurde jedoch nur in transienten Transfektionsexperimenten mit Plasmidvektoren und für transgene Tiere gezeigt und nicht für adenovirale Vektoren. <sup>Wie sich die Gewebespezifität zeigt</sup> Das ~~um zellspezifischer Promotor seine Gewebespezifität~~ in adenoviralen Vektoren <sup>behält</sup> ist prinzipiell nicht voraussagbar. Da der E1A-Enhancer in den rekombinanten Adenoviren noch vorhanden ist (er überlappt mit der Verpackungssequenz  $\psi$  und kann daher nicht deletiert werden (Lit.)) kann es zu Interferenzen mit dem eingefügten Promotor-Enhancer kommen. In der Literaturstelle D4 wird unter anderem der herzmuskelspezifische *cTNC*-Promotor genannt um ihn für einen herzmuskelspezifischen Gentransfer einzusetzen. Weder die Gewebespezifität von *cTNC* noch von einem anderen herzmuskelspezifischen Promotor konnte bisher im adenoviralen Shuttle-Vektor-System nachgewiesen werden. Der von uns untersuchte *mlc-2* Promotor ist bisher der einzige Promotor für den eine herzmuskelspezifische Genexpression in einem adenoviralen Vektor gezeigt wurde. Das die Wahl eines gewebespezifischen Promotors für einen gewebespezifischen Gentransfer durch adenovirale Vektoren nicht trivial ist, und nur bei hinreichender Suche gefunden werden kann, soll an zwei Beispielen demonstriert werden.

Beispiel 1: Der glatte Muskulatur spezifische *smmhc*-Promotor ist inaktiv im adenoviralen Shuttle-Vektor-System.

Kallmeier et al. (1995) konnte zeigen, daß der 1225 bp „smooth muscle myosin heavy chain“-*smmhc*-Promotor des Kaninchens in glatten Muskelzellen spezifisch aktiv war. Im Vergleich zu einer promotorlosen Negativkontrolle erreichte der 1225 bp *smmhc*-Promotor eine 18-fach über dem Hintergrund liegende Luciferaseaktivität. Vor kurzem konnte in unserer Gruppe die Spezifität der Genexpression auch in transgenen Mäusen gezeigt werden. Im adenoviralen Vektorsystem konnten wir für den 1225 bp *smmhc*-Promotor in glatten Muskelzellen keine spezifische Aktivität nachweisen. In Abbildung 2 werden die Ergebnisse der Infektionen gezeigt. Die Luciferaseaktivität wurde in neonatalen Kardiomyozyten, neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen und adulten glatten Gefäßmuskelzellen nach Infektion mit Ad-Luc, Ad-

25-09-96 00:15

Dr. Wolfgang-M. Franz

+49-4503-71002

307

rsvLuc, Ad-mlcLuc und Ad-smmhcLuc bestimmt. Die Infektion erfolgte unter Standardbedingungen mit einer „multiplicity of infection“ von 10. 48 h nach der Infektion wurde die Luciferaseaktivität in den Zellen bestimmt. In Lysaten Ad-rsvLuc infizierter neonataler Kardiomyozyten wurde die höchste Luciferaseaktivität (RLU/ $\mu$ g Protein) gemessen. Sie betrug 300-900 mal mehr als in Lysaten glatter Gefäßmuskelzellen (Abbildung 1). Die Luciferaseaktivität der promotorlosen Negativkontrolle Ad-Luc war in neonatalen Kardiomyozyten 12-45 mal höher als in adulten und neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen (Abbildung 1). Die Luciferaseaktivität Ad-smmhcLuc infizierter neonataler und adulter glatter Gefäßmuskelzellen war 3-4 mal geringer, als die der promotorlosen Kontrolle Ad-Luc. Damit ist Ad-smmhcLuc in glatten Gefäßmuskelzellen inaktiv. In neonatalen Kardiomyozyten war die Luciferaseaktivität von Ad-mlcLuc 21 mal höher, als die von Ad-Luc und 129 mal höher, als die von Ad-smmhcLuc. Hingegen war in neonatalen und adulten glatten Gefäßmuskelzellen, die durch Ad-mlcLuc induzierte Luciferaseaktivität 3-4 mal geringer, als die von Ad-Luc und 2 mal geringer, als die von Ad-smmhcLuc. Damit ist Ad-mlcLuc spezifisch in neonatalen Kardiomyozyten aktiv und erreicht im Vergleich zu Ad-rsvLuc 8% der in neonatalen Kardiomyozyten induzierten Luciferaseaktivität. Es wurde gezeigt, daß der mlc-2 Promotor in neonatalen Kardiomyozyten aktiv ist, während die erwartete Aktivität des smmhc-Promotors in neonatalen und adulten glatten Muskelzellen ausblieb.

Die erzielten Ergebnisse für den smmhc-Promotor wurden bisher nicht veröffentlicht, hauptsächlich da es sich um „negativ“ Ergebnisse handelte. Es ist anzunehmen, daß bereits mehrere muskelspezifische Promotoren in Adenoviren getestet wurden und wegen fehlenden Nachweises der spezifischen Expression nicht veröffentlicht wurden. So steht die Demonstration der herzmuskelspezifischen Genexpression durch den cTNC Promotor bzw. die glatte Muskulatur spezifische Genexpression durch den Endothelin-Promotor von Leiden ebenfalls noch aus. Es erscheint uns daher nicht trivial einen gewebespezifischen Promotor zu charakterisieren, der für einen muskelspezifischen, im vorliegenden Fall einen herzmuskelspezifischen Gentransfer brauchbar ist. Daher halten wir den Nachweis der herzmuskelspezifischen Genexpression durch den mlc-2-Promotor im adenoviralen Shuttle-Vektor-System für eine erfinderische Tätigkeit.

01.10.96

25-03-96 09:15

Dr. Wolfgang-M. Franz

+49-4509-71002

S09

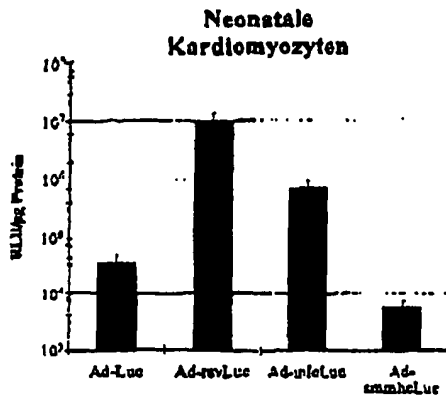
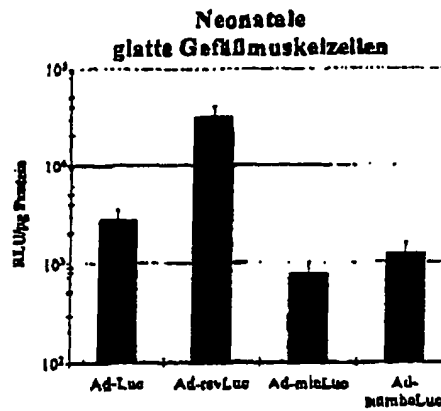
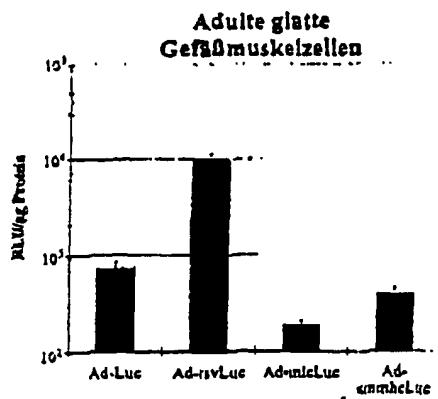


Abbildung 2: Gemessene Luciferaseaktivitäten („Relative Light Units“ (RLU)/µg Protein) nach Infektion von adulten glatten Gefäßmuskelzellen, neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen und neonatalen Kardiomyozyten der Rane mit den rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-revLuc, Ad-micLuc und Ad-ammhLuc. Die Luciferaseaktivität wurde 48 h nach der Infektion (m.o.i. 10) bestimmt. Jede Säule steht für den Mittelwert aus vier Experimenten. Der mittlere Balken gibt die Standardabweichung des Mittelwertes an. Beachte den veränderten Maßstab für neonatale Kardiomyozyten.

25-03-96 00:15

Dr. Wolfgang-M. Franz

01.10.96

+49-4599-71002

S09

Beispiel 2: Der  $\alpha$ mhc-Promotor ist nur unzureichend herzmuskelspezifisch im adenoviralen Vektorsystem.

In einem zweiten Beispiel soll die herausragende Spezifität des mhc-2 Promotors verdeutlicht werden. Hierfür konstruierten wir einen rekombinanten Adenovirus (Ad-mhcLuc) bei dem der dddd bp  $\alpha$ mhc Promotor der Ratte die Expression des Luciferasereportergens kontrollierte. In Abbildung 3 a,b sind die Ergebnisse der Injektion des rekombinanten Adenovirus Ad-mhcLuc und Ad-mhcLuc in die Herzkammer von neonatalen Ratten dargestellt. Nach intrakavitärer Injektion von ca.  $2 \times 10^9$  plaque forming units (Plauebildende Einheiten) des rekombinanten Adenovirus Ad-mhcLuc (3a) und Ad-mhcLuc (3b) in die linke Hauptkammer konnte für beide Viren die höchste Luciferaseaktivität im Herzen nachgewiesen werden. Festzustellen ist, daß Ad-mhcLuc 3-4 mal aktiver im Herzen war als Ad-mhcLuc. In allen anderen Geweben war die durch Ad-mhcLuc induzierte Luciferaseaktivität höher als die von Ad-mhcLuc. In Abbildung 3c wird das Verhältnis der Luciferaseaktivitäten von Ad-mhcLuc und Ad-mhcLuc dargestellt. Es wird deutlich, daß Ad-mhcLuc in der Niere, Milz, Leber, Diaphragma, Lunge und Interkostalmuskel 2-10 fach aktiver ist als Ad-mhcLuc. Damit ist gezeigt, daß der mhc-2-Promotor im adenoviralen Vektorsystem die Expression der Luciferase wesentlich stärker auf das Herz beschränkt als der  $\alpha$ mhc-Promotor. Zusätzlich ist der mhc-2-Promotor im Herzen wesentlich aktiver als der  $\alpha$ mhc-Promotor.

Da der mhc-2-Promotor bisher als einziger Promotor im adenoviralen Shuttle-Vektor-System spezifisch ein Fremdgen im Herzen exprimieren kann, wollen wir dies als überraschenden Vorteil gegenüber dem Stand der Technik geltend machen.

25-09-96 00:15

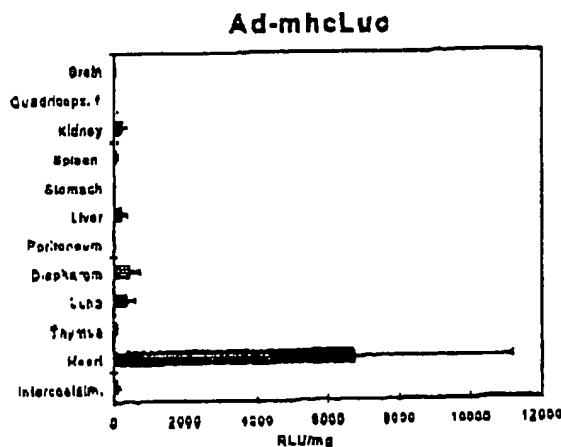
Dr. Wolfgang-M. Franz

01.10.96

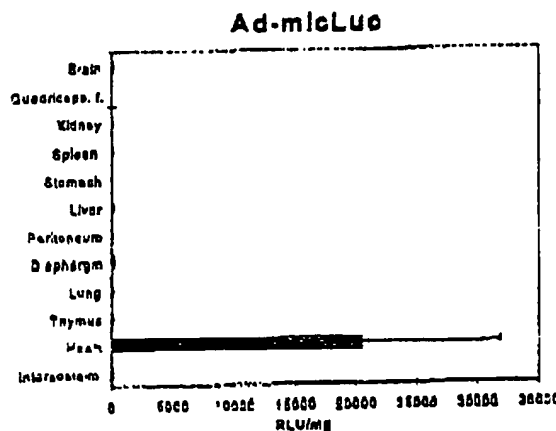
+49-89-27306941

S10

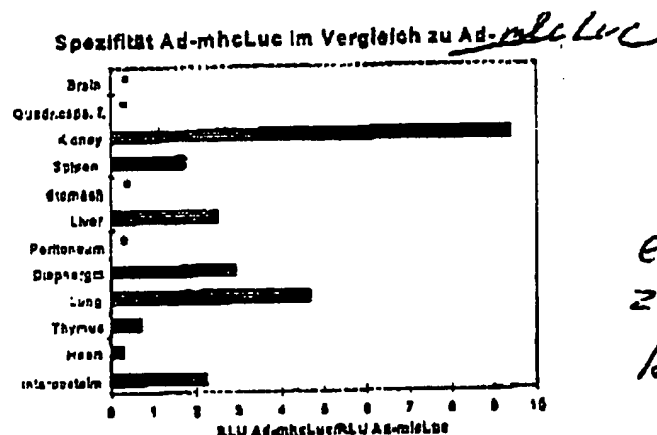
a)



b)



c)



entl. Relation  
zu Background  
Ad/Luc

Abbildung 3: Dargestellt wird die erzielte Luciferaseaktivität (RLU/mg Gewebe) nach intrakavitärer Injektion von ca.  $2 \times 10^9$  plaque forming units (Plaquetbildende Einheit) des rekombinanten Aden virus Ad-mhcLuc (a) und Ad-micLuc (b) in die linke Hauptkammer neonataler Ratten. Beide Viren zeigen die höchste Luciferaseaktivität im Herzen. Ad-micLuc ist 3-4 mal aktiver im Herzen als Ad-mhcLuc. In (c) wird die relative Luciferaseaktivität von Ad-mhcLuc in den verschiedenen Geweben zu der Luciferaseaktivität von Ad-micLuc ins Verhältnis gesetzt. Es wird deutlich, daß Ad-mhcLuc in der Niere, Milz, Leber, Diaphragma, Lunge und Interkostalmuskel 2-10 fach aktiver ist als Ad-micLuc (\* = RLU von Ad-mhcLuc ist kleiner als 50 RLU/mg Gewebe und wird daher nicht für die Auswertung berücksichtigt).

25-09-96 00:15

Dr. Wolfgang-M. Friedl

01.10.96  
49-4509-21002

S11

zu 7) 2. Im Patent von Leiden und Barr (D4) wird die Verwendung eines Herzmuskel-spezifischen Promotors für eine spezifische Genexpression im Herzen vorgeschlagen. Eine Genexpression die im Herzen auf den Ventrikel beschränkt bleibt wurde in D4 nicht genannt. Vor kurzem konnten wir zeigen, daß durch die Verwendung des mlc-2 Promotors eine Ventrikel-spezifische Genexpression nach adenoviralen Gentransfer durch Ad-mlcLuc<sup>Luc</sup> erzielt werden kann (Abbildung 4). Nach Injektion der rekombinanten Adenoviren Ad-rsvLuc, Ad-mlcLuc, Ad-mhcLuc und Ad-Luc wurde <sup>die Genexpression im Ventrikel nur bei Ad-mlcLuc bestimmt.</sup> nur für Ad-mlcLuc eine auf den Ventrikel beschränkte Genexpression bestimmt. Das Verhältnis der Luciferaseaktivität von Ad-mlcLuc im Ventrikel zum Atrium betrug ca. 30, während es für alle anderen Viren 1-2 betrug (s. Abbildung 4). Ein auf den Ventrikel eingeschränkter Gentransfer ist von großem Nutzen. So ist es theoretisch möglich, mit therapeutischen Genen gezielt die Kontraktionskraft des Ventrikels zu steigern. Dies hat aus hämodynamischen Gesichtspunkten eine Reihe von Vorteilen,.... . Damit verfügt das Adenovirus Ad-mlcLuc über eine Reihe von Vorteilen gegenüber dem in D4 beanspruchten Verfahren. Aus diesem Grund halten wir die Etablierung unseres Vektorsystems für einen erfinderische Tätigkeit.

25-09-96 00:15

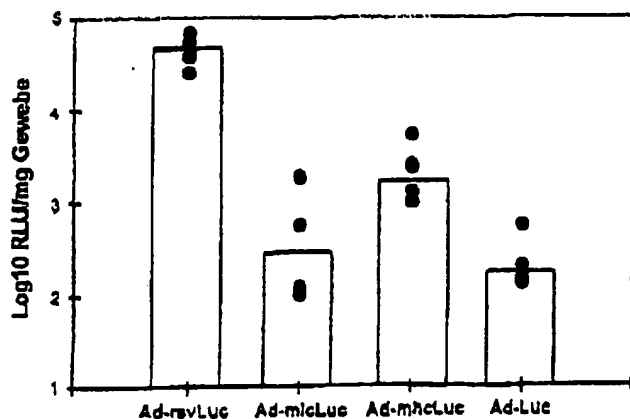
Dr. Wolfgang-M. Franz

01.10.96

+49-89-2730694

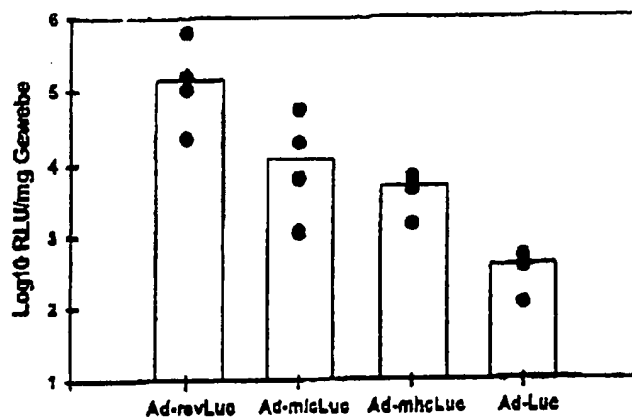
a)

## Atrium



b)

## Ventrikel



c)

## Ventrikel/Atrium

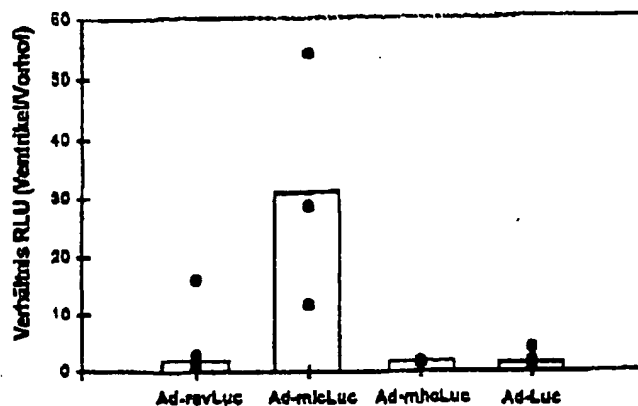


Abbildung 4: Luciferaseaktivität im Atrium (a) und Ventrikel (b) nach Injektion der rekombinanten Adenoviren Ad-rsvLuc, Ad-micLuc, Ad-mhcLuc und Ad-Luc.  $2 \times 10^8$  p.f.u. in einem Volumen von 20-40  $\mu$ l wurden in den linken Ventrikel neonataler Ratten injiziert. Die Gewebe wurden fünf Tage nach der Injektion analysiert. Die Luciferaseaktivität wird gemessen in „Relative Light Unit“ (RLU)/mg Gewebe (Naßgewicht). Die Säulen zeigen den Median aus vier Experimenten an, die Punkte geben die Ergebnisse der Versuchstiere an. (c) Verhältnis der Luciferaseaktivität (RLU) im Ventrikel und Vorhof. Die Punkte geben die Verhältnisse der Aktivitäten im Ventrikel und Vorhof für ein Tier an. Der Balken gibt den Median an.

11 ~~11~~. Vektorsystem nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch einen Genshuttle auf der Basis einer Lipofektion

20

12 ~~12~~. Vektor-System nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß als therapeutisches Gen die cDNA eines Gens verwendet wird, das bei der zu behandelnden Krankheit qualitativ oder quantitativ verändert ist.

13 ~~13~~. Vektorsystem nach Anspruch 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß der ventrikuläre MLC-2-Promotor als Fusionskonstrukt mit Luciferase eingesetzt wird.

14 ~~14~~. Vektorsystem nach Anspruch 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß das MLC2/Luciferase-Fusionskonstrukt durch Klonierung des BamHI/KpnI MLC-Luciferase-Fragments(ca. 0,8 Kb "myosin light chain"-2v-Promotor und 1,8 Kb Luciferasegen) aus Plasmid pMLCL 5' direkt in die BamHI/KpnI-Schnittstellen des Plasmids pAd-RSVBg<sub>al</sub>-erhalten wird.

15 ~~15~~. Vektor-System nach Anspruch 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß Teile oder Varianten des MLC-2-Promotors eingesetzt werden.

16 ~~16~~. Verfahren zur Herstellung des Vektor-Systems nach Anspruch 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß in einem adenoviralen Vektor die E1-Genregion oder eine andere Region durch ein therapeutisches Gen mit dem MLC-2-Promotor ersetzt wird.

**CERTIFICATION**

This is to certify that the attached English language document identified as "Vector System for Specific in vivo Gene Expression in Heart Muscle Cells," is a true and accurate translation of the corresponding German Language document No. DE-196-40-630.7 to the best of my knowledge and belief.

Date: March 17, 2004

Edeltraud F. Mahaney  
Edeltraud F. Mahaney  
Certified ATA Member  
No. 231343

October 1, 1996

PCT/DE 96/02181

**FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY**

(GERMAN COAT OF ARMS)

**CERTIFICATION**

(Stamp: Priority Document)

Dr. Wolfgang-M. F r a n z in Gross Groenau/Germany has filed with the German Patent Office a patent application with the title

"Vector System for specific in vivo Gene Expression in Heart Muscle Cells"

on October 1, 1996.

The attached document is a true and accurate copy of the original of this patent application.

The application was tentatively assigned the International Patent Classification symbols C 12 N and A 61 K by the German Patent Office.

Munich, April 24, 1997

for

The President of the German Patent Office

signed: Hoiß

Reference No.: 196 40 630.7

October 1, 1996

**Vector system for specific in vivo gene expression in heart muscle cells**

Applicant: Dr. Wolfgang-M. Franz

Inventors: Dr. Wolfgang-M. Franz, Thomas Rothmann, Prof.Dr.  
Hugo Katus

**Summary**

The invention relates to a vector system, which allows specific gene expression in heart muscle cells in vivo.

The vector system of this invention is part of a viral or non-viral gene shuttle, into which any gene, or any functional DNA fragment, coupled to the regulatory DNA sequence of the cardiac myosin light chain (MLC)-2, is cloned.

Fields of application are the medical field, gene technology, and the pharmaceutical industry.

This vector system has the characteristic for specific gene expression in the heart muscle tissue, preferably in the ventricle in vivo, so that any gene, coupled to the regulatory DNA sequence of myosin light chain (MLC)-2, can be specifically expressed with varying objectives.

**Patent Claims**

1. Vector system for specific in vivo gene expression in heart muscle cells, preferably in the ventricle, characterized in that  
it is part of a viral or non-viral gene shuttle, into which any gene, or any functional DNA fragment, coupled to the regulatory DNA sequence of MLC-2, is cloned.

October 1, 1996

2. Vector system according to claim 1,  
characterized in that  
the selected gene, or the selected functional DNA fragment,  
includes an intron and poly-A sequence.
3. Vector system according to claims 1 and 2,  
characterized in that  
parts and variants of the regulatory MLC-2 sequence of the rat  
or any other species, preferably human or mammal, are applied.
4. Vector system according to claims 1 to 3,  
characterized in that  
a viral gene shuttle system is applied.
5. Vector system according to claims 1 to 3,  
characterized in that  
a replication-deficient adenoviral gene shuttle system is  
applied.
6. Vector system according to claims 1 to 3,  
characterized in that  
an adeno-associated gene shuttle is applied.
7. Vector system according to claims 1 to 3,  
characterized in that  
a non-viral gene shuttle system is applied.
8. Vector system according to claims 1 to 3,  
characterized in that  
a gene shuttle based on a lipofection is applied.
9. Application of the vector system according to claims 1 to 3,

October 1, 1996

characterized in that

as part of a viral, or non-viral, gene shuttle, it controls the targeted expression of a therapeutic DNA that is to be altered, qualitatively or quantitatively, in a disease to be treated.

10. Application of the vector system according to claims 1 to 3 pertaining to gene therapy, whereby the recombinant vector system is applied via the blood stream, preferably via a modified catheter method, to the arterial or venous coronary system.

October 1, 1996

## Description

### **Heartmuscle-specific gene expression through replication-deficient recombinant adenoviruses**

#### **Abstract**

Recombinant adenoviruses are very promising shuttle vectors for a future gene therapy of heart muscle disorders. Their capability to infect various cell types can, however, result in the expression of presumed therapeutic genes outside the heart muscle and, thus, in undesirable risks. In order to limit the gene expression of cardiomyocytes, a recombinant adenovirus (Ad-mlcLuc) was constructed, in which the heart muscle-specific myosin light chain-2v (mlc-2v) promoter of the rat regulates the transcription of a luciferase reporter gene. For controls, the corresponding adenoviral constructs without the promoter (Ad-Luc) and with the "Rous Sarcoma Virus" (RSV) (rsv) promoter (Ad-rsvLuc) were constructed. Our data shows that the new viral vector Ad-mlcLuc was active in vitro specifically in primary rat cardiomyocytes, but not, however, in three established cell lines (HeLa, H9c2, and A10). By injection of the recombinant adenoviruses into the heart chamber of neonatal rats, the heart muscle-specific gene expression of Ad-mlcLuc in vivo was proven, although varying quantities of adenoviral DNA could be proven by PCR analysis in all examined tissues of the infected animals. In vitro and in vivo, the mlc-2v promoter was active specifically in heart muscle cells and reached 8-9% of the luciferase activity of the rsv promoters there. The direct injection of Ad-mlcLuc into the upper thigh muscle of neonatal rats only resulted in a background activity for luciferase of approximately 0.05% as compared to Ad-rsvLuc. In the adenoviral shuttle vector system, the mlc-2v promoter allows the heart

October 1, 1996

muscle-specific gene expression of a foreign gene and is, therefore, a beneficial vehicle for a targeted gene transfer to the heart.

Keywords: Adenovirus, heart muscle, myosin light chain-2v promoter, gene expression

## **Introduction**

The newly established adenoviral vector Ad-mlcLuc is active in vitro specifically in heart muscle cells of neonatal rats. Furthermore, the myosin light chain-2v (mlc-2v) promoter leads in vivo to a specific luciferase expression in the heart. In eleven other examined tissues (intercostal muscle, thymus, lungs, diaphragm, stomach muscle, liver, stomach, spleen, kidney, brain and quadriceps femoris muscle), no luciferase expression by the mlc-2v promoter occurred, although adenoviral DNA could be proven in these tissues by polymerase chain reaction (PCR) and southernblot. The direct injection of Ad-mlcLuc into the upper thigh muscle of neonatal rats confirmed that the mlc-2v promoter is active not in the skeletal muscle but only in the heart muscle. Adenoviral vectors, where a foreign gene is under the control of the mlc-2v promoter, are, therefore, a beneficial vehicle for a targeted gene transfer to the heart.

## **Results**

### **Construction of the recombinant adenoviruses**

To confirm the specificity of the mlc-2v promoter, three different recombinant adenoviruses were constructed (see Fig. 1 a-c). The construction of the replication-deficient adenoviruses was done by homologous recombination of the cloned plasmids pAd-mlcLuc, pAd-rsvLuc and pAd-Luc with the previously isolated large ClaI fragment of del324-mutant of the adenovirus

October 1, 1996

5. After cotransfection in 293 cells, viral plaques were examined for correct integration of the transgene and were multiplied on 293 cells by cloning. The recombinant adenoviruses carry the luciferase reporter gene in 3'-direction from the packaging sequence in the former E1 region. In the recombinant adenovirus Ad-mlcLuc, the heart muscle-specific myosin light chain 2v (mlc-2v) promoter controls the expression of the luciferase gene, in Ad-rsvLuc the "Rous Sarcoma Virus" (rsv) promoter controls it. In the adenovirus Ad-Luc, the luciferase gene was integrated into the adenoviral genome without a promoter and, thus, served as negative control.

**Expression of the transgene in the established cell lines HeLa, H9c2, and A10 as well as in neonatal cardiomyocytes of the rat after infection with recombinant adenoviruses**

The luciferase activity was determined in HeLa (human cervix carcinoma), H9c2 (rat, heart myoblast), A10 (rat, aorta) cells and in neonatal cardiomyocytes of the rat after injection with the recombinant adenoviruses Ad-Luc, Ad-rsvLuc and Ad-mlcLuc. The infection was done under standard conditions with a multiplicity of infection (m.o.i.) of 10. 48 hours after the infection, the luciferase activity in the cells was determined. In neonatal rat cardiomyocytes, the highest luciferase activity, as compared to the established cell lines HeLa, H9c2, and A10, after injection of Ad-Luc was measured. In neonatal cardiomyocytes infected with lysates Ad-rsvLuc (positive control), the altogether highest luciferase activity (in Relative Light Units (RLU) pro  $\mu$ g protein) was found, whereby the results for the various cell lines barely differed. In HeLa, H9c2, and A10 cells, the luciferase activity of Ad-mlcLuc

October 1, 1996

was comparable with the negative control Ad-Luc, whereas in neonatal cardiomyocytes of the rat, it was higher by the factor 21 for Ad-mlcLuc than it was for Ad-Luc and there achieved 8% of the luciferase activity induced by Ad-rsvLuc.

#### **Expression of the transgene after injection of recombinant adenoviruses into the heart chamber of neonatal rats**

In order to examine the heart muscle-specific activity of the recombinant adenovirus Ad-mlcLuc, 20  $\mu$ l each ( $= 2 \times 10^9$  plaque-forming units (p.f.u.)) of the recombinant adenoviruses were injected directly into the heart chambers of neonatal rats. In the same way, Ad-rsvLuc as positive control and Ad-Luc as negative control were also injected. Five days after the injection, the luciferase activity in 12 different tissues (intercostal muscle, thymus, lungs, diaphragm, stomach muscle, liver, stomach, spleen, kidney, brain and quadriceps femoris-muscle), was determined. The measured luciferase activity in RLU/mg tissue is summarized in Fig. 2. Adenovirus Ad-mlcLuc, which carries the heart muscle-specific mlc-2v promoter, showed a luciferase activity that remained limited to the heart muscle (Fig. 2a). The injection of the positive control Ad-rsvLuc showed the highest luciferase activity in the intercostal muscle, in the heart, and strong luciferase activity in the lungs, thymus, and the diaphragm (Fig. 2b). In the animal injected with Ad-Luc-, a low luciferase activity was measured in the intercostal muscle, heart, thymus and diaphragm (Fig. 2c). In the heart, the Ad-mlcLuc-induced luciferase activity was 17 times higher than the one induced by Ad-Luc, whereas in all other tissues the luciferase activity of Ad-Luc and Ad-mlcLuc was comparably strong. This demonstrates that Ad-mlcLuc is

October 1, 1996

active specifically in the heart. Compared to Ad-rsvLuc, Ad-mlcLuc achieved 9% of the RSV promoter activity in the heart. The distribution of infected heart muscle cells after injection of adenoviruses into the heart chamber of neonatal rats was additionally tested in preliminary experiments by injection of the recombinant adenovirus Ad-rsv $\beta$ gal. The recombinant adenovirus Ad-rsv $\beta$ gal expresses the  $\beta$ -galactosidase as reporter gene under the control of the "Rous Sarcoma Virus" (rsv) promoter. Five days after the injection, the animal was dissected and the expression of the  $\beta$ -galactosidase was determined according to the coloration of the transgene. In the histologic sections, infected cells can be identified by a blue coloration of the core. Approximately one half of the myocardial  $\beta$ -galactosidase activity appears in the area around the needle penetration point into the heart chamber. Along the canal of the injection needle,  $\beta$ -galactosidase activity was found in almost all cardiomyocytes (Fig. 3a), whereas in the remaining myocardium the number of infected cardiomyocytes was low (Fig. 3b).

**Expression of the transgene after injection of recombinant adenoviruses into the upper thigh muscles of neonatal rats**

In order to examine the activity of the mlc-2v promoter in skeletal muscles, 20  $\mu$ l with  $2 \times 10^9$  plaque-forming units (p.f.u.) of the three recombinant adenoviruses Ad-Luc, Ad-rsvLuc and Ad-mlcLuc were injected into the right upper thigh quadriceps femoris muscle of neonatal rats. Five days after the injection, the luciferase activity was determined. Ad-Luc and Ad-mlcLuc showed comparable low luciferase activities (RLU/mg tissue) in the injected muscle, whereas Ad-rsvLuc was very highly active (chart 1). The luciferase activity, achieved with Ad-mlcLuc),

October 1, 1996

was 0.05% of Ad-rsvLuc. This data shows that Ad-mlcLuc is not active in the skeletal muscle and confirms the heart muscle-specific gene expression by the recombinant adenovirus Ad-mlcLuc.

#### **Evidence of adenoviral DNA in tissue after injection of recombinant adenoviruses in the heart chamber**

In order to determine the extent of the infection of non-heart tissue after injection of recombinant adenoviruses into the heart chamber, the genomic DNA from 12 types of tissue (intercostal muscle, heart, thymus, lungs, diaphragm, stomach muscles, liver, stomach, spleen, kidney, brain and quadriceps femoris muscle) was isolated and the presence of the adenoviral DNA in these tissues was determined by polymerase chain reaction (PCR). The tissues of two animals each infected with Ad-Luc, Ad-rsvLuc and Ad-mlcLuc were examined. In preliminary experiments, the sensitivity of the evidence of adenoviral DNA was determined, whereby 100 ng of genomic DNA of non-infected rats were mixed with decreasing quantities of adenoviral DNA Ad del 324 (from 10 pg to 0.1 fg) and subsequently examined using PCR. It was found that 10 fg of the adenoviral DNA Ad del 324 in 100 ng of genomic DNA of non-infected animals could still be proven. This is the equivalence of 0.017 adenoviral genomes per cell (Fig. 4a). In animals infected with the adenovirus, the viral DNA could be proven regularly in the intercostal muscle, heart, thymus, lungs, diaphragm and liver (Fig. 4b illustrates 3 representative animals). In order to increase the sensitivity of the evidence of the adenoviral DNA, the PCR products were transferred to a nylon membrane and verified by Southern blot hybridization. This showed that adenoviral DNA can also be verified, in low quantities, in other tissues, with little

October 1, 1996

difference between the individual animals. Fig. 4c illustrates a representative Southern blot for an animal injected with Ad-mlcLuc.

The described experiments show that the gene expression of the recombinant adenovirus Ad-mlcLuc is to be attributed to the heart muscle-specific mlc-2v promoter rather than to the locally increased virus concentration.

### **Discussion**

We describe a new adenoviral shuttle vector, Ad-mlcLuc, which, for the first time, allows the exclusive expression of a transgene in cardiomyocytes. This is achieved with a heart muscle-specific mlc-2v promoter, which expresses the transgene in the recombinant adenovirus Ad-mlcLuc (18, 30). The specific gene expression with Ad-mlcLuc was shown in vitro in neonatal cardiomyocytes, and in vivo in the heart muscle.

With the negative control Ad-Luc, under identical injection conditions, the highest luciferase activity was determined in neonatal cardiomyocytes; it was eight times higher than in H9c2 cells, 20 times higher than in HeLa cells, and seven times higher than in A10 cells. This higher luciferase activity in neonatal cardiomyocytes could be explained by the better infectability of these cells by the adenoviruses.

The injection of the recombinant adenoviruses Ad-Luc, Ad-mlcLuc and Ad-rsvLuc into the heart chamber of the neonatal rats showed the heart muscle-specific gene expression of Ad-mlcLuc in vivo. In the heart muscle of animals infected with Ad-mlcLuc, a luciferase activity 17 times higher than for the negative control Ad-Luc was determined. Compared to Ad-rsvLuc, Ad-mlcLuc

October 1, 1996

achieved 9% of the luciferase activity in the heart muscle. Thus, the relative (sic) luciferase activities of the viruses in neonatal cardiomyocytes in vitro and in the neonatal heart in vivo are very comparable. In 11 additional examined tissues (intercostal muscle, thymus, lung, diaphragm, abdominal muscle, liver, stomach, spleen, kidney, brain, quadriceps femoris muscle), the luciferase activity after injection of Ad-mlcLuc was not higher than after injection of the promoter-free control Ad-Luc. It is noted that a low luciferase activity was evident in heart, diaphragm and intercostal muscle after injection of Ad-Luc. This basic activity may be due to the cryptic promoter activity of viral DNA sequences.

In contrast to Ad-mlcLuc, a high luciferase expression after injection of Ad-rsvLuc in intercostal muscles, thymus, lungs and diaphragm could be proven. The luciferase expression in these tissues was also observed after intracavitary injection of an adenoviral vector, whereby the cytomegalovirus (CMV) promoter drives the luciferase expression (16).

To obtain additional criteria for the specificity of the luciferase expression, the presence of the adenoviral DNA in various tissues was determined by PCR. After intracavitary injection of the viruses, the adenoviral DNA was proven in the intercostal muscle, heart, thymus, in the lungs, the diaphragm and in the liver. With the exception of the liver, these are the same tissues in which the luciferase expression after injection of Ad-rsvLuc was also verified. The absence of luciferase activity in the liver, despite evidence of adenoviral DNA in this tissue, may be due to the low RSV promoter activity in the liver. It has been shown in a transgenic mouse model that the RSV promoter is largely inactive in the liver (20).

October 1, 1996

Thus, the adenoviral DNA provable by PCR correlates very well with the luciferase activity in animals injected with Ad-rsvLuc. In contrast with Ad-rsvLuc, the luciferase activity in the animal injected with Ad-mlcLuc remained limited to the heart, although the adenoviral DNA was clearly proven in other tissues. Consequently, with the recombinant adenovirus Ad-mlcLuc, heart muscle-specific gene expression can be assured. The heart muscle-specific expression of Ad-mlcLuc was confirmed by the results of the injection of the recombinant viruses into the upper thigh muscle of the neonatal rats. While Ad-mlcLuc and Ad-Luc showed comparatively low luciferase activities after direct injection into the upper thigh of neonatal rats, Ad-rsvLuc was very strongly active. Ad-Luc and Ad-mlcLuc in the injected skeletal muscle only achieved 0.05% of the luciferase activity of Ad-rsvLuc.

The ability to program the recombinant gene expression so that it remains limited to the myocardium could be beneficial for the therapy of cardiovascular diseases. For example, for patients with X chromosomal cardiomyopathy based on a defective dystrophin protein, the expression of dystrophin in the heart muscle could lead to a significant improvement of the cardiomyopathy (3). In prior experiments with adenoviral vectors, gene expression limited to cardiomyocytes could not be assured (4, 16, 17). After application of the adenoviruses, the expression of the transgene in various non-cardiomyocytes was observed. Side effects based on an undesired expression of the transgene in non-target cells lead to well-founded safety considerations. Intracardial injection of the recombinant adenovirus AdShK caused, for example, a strong expression of the *Drosophila* Shaker potassium channel in the liver. As the authors stated, phenotypically, this could have considerable

October 1, 1996

consequences inasmuch as the membrane potential of the hepatocytes is responsible for the cellular absorption of gallic acid (37). By using the new adenoviral vector Ad-mlcLuc, which allows a heart muscle-specific gene expression, such side effects on non-cardial target cells could be avoided.

Since the recombinant adenovirus Ad-mlcLuc is a first-generation vector, the gene expression is time-limited to a few weeks. This may be of advantage in some cases, however, in other cases an expression of longer duration would possibly be more desirable. The presently still limited duration of the expression of the transgene could possibly overcome in the future by constructing second and third-generation adenoviral vectors. A combination of the tissue-specific mlc-2v promoter and second and third-generation adenoviral vectors could lead to recombinant adenoviruses that allow a prolonged and heart muscle-specific gene expression and, thus, are suited for the therapy of heart muscle disorders like dilative or hypertrophic cardiomyopathy.

## **Materials and Methods**

### **Construction of the recombinant plasmids pAd-Luc, pAd-rsvLuc, and pAd-mlcLuc**

The plasmids pAd-Luc, pAd-rsvLuc and pAd-mlcLuc are deviates of the plasmid pAd.RSV- $\beta$ gal, in which the BamHI-KpnI RSV- $\beta$ gal (Rous Sarcoma Virus Promoter and  $\beta$ -galactosidase reporter gene) cassette is replaced with the luciferase cDNA with its endogenous polyadenylation signal (15). For this, the HindIII/KpnI fragment of the plasmid pSVOAL 5', which encodes

October 1, 1996

for the luciferase gene, was sub-cloned into the HindIII/KpnI cloning interfaces of the vector pBluescriptSK (Stratagene), thereby producing the plasmid pBluescript-Luc (27). The BamHI/KpnI luciferase fragment of the subclone pBluescript-Luc was subsequently cloned into the BamHI/KpnI interfaces of the plasmid pAd.RSV- $\beta$ gal, thus producing the plasmid pAd-Luc. For the cloning of the plasmid pAd-rsvLuc, the BamHI/HindIII RSV fragment (587 bp) of the plasmid pAd.RSV- $\beta$ gal was cloned into the BamHI/HindIII sites of the subclone pBluescript-Luc, thus producing the plasmid pBluescript-rsvLuc. Thereafter, the BamHI/KpnI RSV luciferase fragment of the plasmid pBluescript-rsvLuc was cloned into the BamHI/KpnI sites of pAd.RSV- $\beta$ gal, thus producing the plasmid pAd-rsvLuc. To produce the plasmid pAd-mlcLuc, the BamHI/KpnI mlc-luciferase fragment (circa 0.8 kb of myosin light chain-2v promoter and 1.8 kb luciferase gene) from plasmid pMLCL 5" was cloned directly into the BamHI/KpnI sites of the plasmid pAd-RSV $\beta$ gal (30).

### **Construction of the recombinant adenoviruses**

The recombinant adenoviruses were constructed by homologous recombination between the plasmids pAd-Luc, pAd-rsvLuc and pAd-mlcLuc and the genomic DNA of adenovirus del324 (Ad5) in 293 cells (15, 26). A day before the transfection,  $2 \times 10^6$  293 cells were flattened in a small cell culture dish. Five  $\mu$ g of the large ClaI fragment of the genomic DNA of Ad5, together with 5  $\mu$ g of the AatII linearized plasmids pAdLuc, pAd-rsvLuc and pAd-mlcLuc, were cotransfected in 293 cells using the calcium phosphate method. After coating with soft agar (1% SeaPlaque Agarose, 1x MEM, 2% FCS, 100 U/ml penicillin, 0.1  $\mu$ g/ml streptomycin, 2 mM L-Glutamine) and 8-10 days of incubation at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, viral plaques were removed and multiplied on 293

October 1, 1996

cells by cloning. From  $2 \times 10^6$  completely infected 293 cells, the viral DNA of the recombinant viruses were isolated and tested for the correct integration of the transgene by hydrolysis with restriction endonucleases. From the positive viral clones, an additional single-plaque purification was done before they were multiplied in 293 cells for amplification and purified two times by cesium chloride density gradient centrifugation (15). Finally, the viruses were dialyzed against TD buffer (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10% (v/v) glycerol, 25 mM Tris-HCl pH 7.4) and frozen at  $-72^\circ\text{C}$ . To determine the titer of the prepared adenoviruses, the plaque assay was conducted using 293 cells (15). All recombinant adenoviruses had a titer of approximately  $10^{11}$  plaque-forming units (p.f.u.)/ml. The DNA of the original viral solutions was isolated and examined for the correct integration of the inserts using restriction enzyme analysis and PCR. Furthermore, the original viral solutions were tested for the wild-type Ad-5 using PCR, whereby in 50 ng of the adenoviral DNA there was no evidence of contamination (38).

#### **Infection of cells in tissue cultures (in vitro)**

Primary neonatal rat cardiomyocytes were prepared and cultivated, as described in Sen et al., 1988. A10, H9c2 and HeLa cells were cultivated in "Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), and 293 cells in MEM, complemented with 10% fetal calf serum (FCS), 100 U/ml penicillin, 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin and 2 mM L-Glutamine. A day before the infection,  $2 \times 10^5$  freshly prepared neonatal cardiomyocytes or  $1 \times 10^5$  cells of the established cell lines H9c2, A10 and HeLa were plated, in triplicate, in "12 well" culture dishes. The cells were incubated in 0.2 ml each of the serum-free medium, which contained the recombinant adenoviruses Ad-Luc, Ad-rsvLuc and Ad-

October 1, 1996

mlcLuc at a multiplicity of infection (m.o.i.) of 10 (10 viruses/cell). After 1 hour of incubation at 37°C with gentle rotation every 15 minutes, 2 ml of each of the complete medium were added. All infection experiments were repeated 4 to 5 times.

#### **Luciferase Determination**

For the in vitro studies, the cells were harvested 48 hours after the infection. Subsequently, the luciferase activity in protein extracts was determined according to established protocols using transilluminometer Lumat LB 9501 (Bertold, Wildbad) (40). The protein concentration of the lysates was determined according to *Bradford* (1976) (BioRad, Munich). The luciferase activity was converted to pg luciferase per  $\mu$ g protein, as described (10, 18). For the in vivo studies, the rats were decapitated five days after injection. Twelve different types of tissue (intercostal muscle, heart, thymus, lung, diaphragm, abdominal muscle, liver, stomach, spleen, kidney, quadriceps femoris muscle, brain) were removed and immediately frozen in liquid N<sub>2</sub>. Next, the tissue samples were weighed, placed in 200  $\mu$ l lyse buffer (1% v/v Triton X-100, 1 mM DTT, 100 mM potassium phosphate pH 7.8), unlocked in a glass homogenizer and centrifuged for 15 minutes at 4°C in a cold centrifuge. The supernatant was used for the luciferase determination (31, 40). The luciferase activity was measured in relative light units (RLU)/mg tissue wet weight, after deducting the background activity, which for the different tissues was determined in non-infected animals.

October 1, 1996

### **In vivo injections into the heart chamber and the upper thigh muscle**

All injections were given to specific pathogen-free Sprague-Dawley rats (CRWiga, Sulzfeld), 2-3 days old. Prior to the injections, the neonatal rats were narcotized by 3-5 minute inhalation of Methoxyfluran (Metofane, Jann=ssen GmbH).  $2 \times 10^9$  plaque-forming units (p.f.u.) of the recombinant adenoviruses Ad-Luc, Ad-rsvLuc, and Ad-mlcLuc were injected at a volume of 20  $\mu$ l using a tuberculin syringe (27.5 gauge). The injection was done by direct puncture of the heart chamber through the chest laterally in the fourth intercostal area. It was made certain, by aspiration of heart blood, that the tip of the needle was in an intracavitary position. A slow injection of the viruses (20  $\mu$ l/min) was accomplished by a homemade attachment to the tuberculin syringe. The injection of the recombinant adenoviruses in quadriceps femoris was done accordingly.

### **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Parallel to the luciferase determinations, genomic DNA was extracted from the sediments of the tissue homogenates of the neonatal rats infected with adenoviruses using the QIAamp Tissue Kit (Firm of Quiagen, Hilden) in accordance with manufacturer's instructions. Two each of the animals infected with Ad-Luc, Ad-rsv-Luc and Ad-mlcLuc were examined for the tissue distribution of the injected viruses by means of PCR for proof of adenoviral DNA, as described by Zhang et al., 1995, with few deviations (38). A test sample of one hundred ng of genomic DNA, together with 40 ng of oligonucleotide E2B-1 and E2B-2 and 1.25 U Taq polymerase by Promega, was placed in a reaction volume of 25  $\mu$ l (38). Gel electrophoresis of the specific PCR product yielded an 860 bp Band.

October 1, 1996

The sensitivity of the PCR was determined in preliminary experiments, whereby 100 ng of genomic DNA from a non-infected rat were mixed in decreasing quantities of AdDel324 DNA and inserted in a polymerase chain reaction as a test sample. In order to increase the sensitivity of the evidence of the PCR, the PCR products were transferred by capillary blot to a GeneScreenPlus nylon membrane (NEN, Boston, Massachusetts), and subsequently proven by Southern blot hybridization (40). The adenoviral 860 bp DNA fragment of the positive control, amplified by PCR, was used for a probe. The PCR product was purified from the gel and radioactively labeled with  $^{32}\text{P}$  by random hexanucleotide priming, and used as a test sample for the hybridization (40). In this way, the sensitivity of the PCR evidence could be improved by a factor of 10 to 100.

#### **$\beta$ -Galactosidase Determination**

The hearts of neonatal rats were frozen in  $\text{N}_2$  chilled isopentane and stored at  $-70^\circ\text{C}$ . The heart tissue was embedded in O.C.T. (Tissue Tek, Miles, USA) freezing medium, and  $10\ \mu\text{m}$  tissue sections with a cryostat (Frigocut 2800 E, Leica) were made. Next, the sections were fixed for 10 minutes in solution A (PBS, 0.2% (v/v) glutaraldehyde, 5 mM EDTA, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ), washed with solution B (PBS, 0.01% (v/v) Na-desoxycholate, 0.02% (v/v) Nonidet P40, 5 mM EDTA, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ), and stained overnight at  $37^\circ\text{C}$  in solution C (solution B + 1 mg/ml X-Gal, 5 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 5 mM  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ). Next came a washing of 10 minutes, once with solution B and once with distilled water. A weak counter-staining with hematoxylin and eosin as well as dehydrating and embedding of the test material was done in accordance with standard protocols (41).

01.10.98

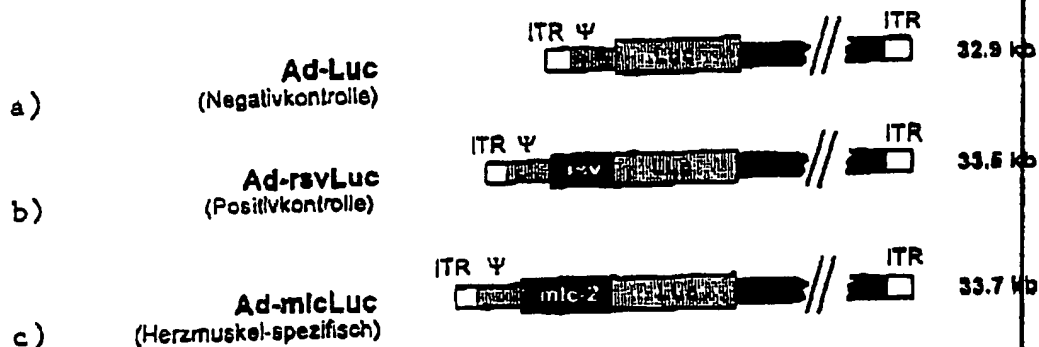


Abbildung 1: Replikationsdefiziente rekombinante Adenoviren wurden durch homologe Rekombination in 293-Zellen erzeugt. Die erhaltenen Viren stammen vom Adenovirus del324 ab, wobei das Luciferasegen in die ehemalige E1-Region kloniert wurde. Die Expression des Luciferasegens wird entweder durch keinen Promotor (Ad-Luc/Negativkontrolle) (a), den rsv Promotor (Ad-rsvLuc/Positivkontrolle) (b), oder den mlc-2v Promotor (Ad-mlcLuc/Herzmuskel-spezifisch) kontrolliert. (ITR = „Inverted Terminal Repeats“,  $\Psi$  = Verpackungssequenz, rsv = „Rous Sarkoma Virus“, mlc-2 = „myosin light chain“-2v Promotor).

October 1, 1996

**Fig. 1:** Replication-deficient recombinant adenoviruses were constructed by homologous recombination in 293 cells. The viruses thus generated originate from the adenovirus del324, whereby the luciferase gene was cloned into the former E1 region. The expression of the luciferase gene is controlled either by no promoter (Ad-Luc/negative control) (a), by the rsv promoter (Ad-rsvLuc/positive control) (b), or the mlc-2v promoter (Ad-mlcLuc/heart muscle-specific). (ITR = Inverted Terminal Repeats, = packaging sequence, rsv = Rous Sarkoma Virus, mlc-2 = myosin light chain-2v promoter).

04-11-02

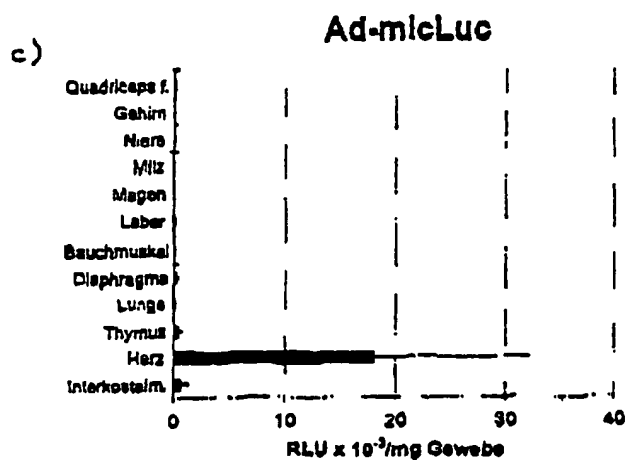
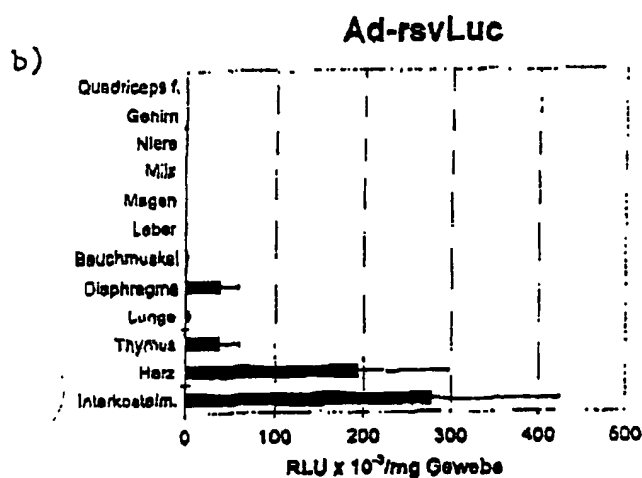
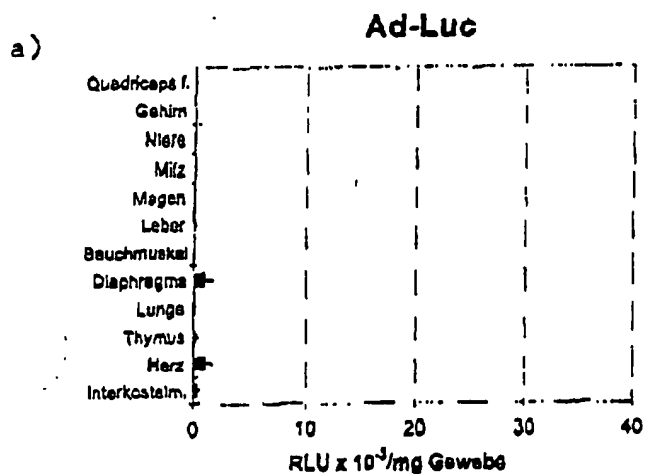


Abbildung 2: Luciferaseaktivität in 12 verschiedenen Geweben nach Injektion der rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-micLuc.  $2 \times 10^6$  p.f.u. in einem Volumen von 20  $\mu$ l wurden in die Herzkammer neonataler Ratten injiziert. Die Gewebe wurden fünf Tage nach der Injektion analysiert. Die Luciferaseaktivität wird angegeben in „Relative Light Unit“ (RLU)/mg Gewebe (Naßgewicht). Die Säulen zeigen den Mittelwert aus vier Experimenten an, der mittlere Balken gibt die Standardabweichung des Mittelwertes an. Maßstab von Ad-rsvLuc beachten.

October 1, 1996

**Fig. 2:** Luciferase activity in 12 different tissues after injection of the recombinant adenoviruses Ad-Luc, Ad-rsvLuc, and Ad-mlcLuc.  $2 \times 10^9$  p.f.u. at a volume of 20  $\mu$ l were injected into the heart chamber of neonatal rats. The tissue was analyzed five days after the injection. The luciferase activity is given in "relative light unit" (RLU)/mg tissue (wet weight). The columns show the average value from four experiments, the bar in the middle indicates the standard deviation of the average value. Note of the scale of Ad-rsvLuc.

(Legend (top to bottom): quadriceps femoris muscle, brain, kidney, spleen, stomach, liver, abdominal muscle, diaphragm, lung, thymus, heart, intercostal muscle)

0044-971000

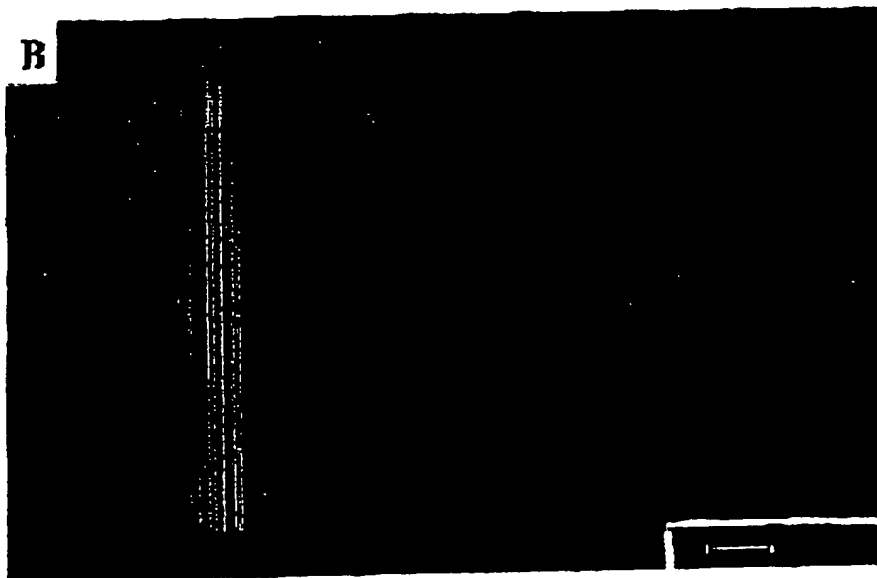


Abbildung 3 : Histologischer Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität im Myokard 5 Tage nach intrakavitärer Injektion des Adenovirus Ad.RSV $\beta$ gal. (A) Fotografie eines histologischen Schnittes durch den Apex (Injektionsstelle). (B) Fotografie eines histologischen Schnittes durch den linken Ventrikel. Blaufärbung repräsentiert  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität. Der Balken entspricht 100  $\mu$ m.

October 1, 1996

**Fig. 3:** Histologic verification of  $\beta$ -galactosidase activity in the myocard five days after intracavitary injection of the adenovirus Ad.RSV $\beta$ gal. (A) Photograph of a histologic section through the apex (injection point). (B) Photograph of a histologic section through the left ventricle. The blue coloration represents  $\beta$ -galactosidase activity. The bar equals 100  $\mu$ m.

01.10.98

2

	Ad-Luc	Ad-rsvLuc	Ad-mloLuc
RLU $\times 10^{-3}$ /mg Quadriceps f.	3,4 $\pm$ 1,2	5620 $\pm$ 2239	2,8 $\pm$ 0,8

Tabelle 1: Luciferaseaktivität im Quadriceps f. fünf Tage nach Injektion von  $2 \times 10^9$  p.f.u. (20  $\mu$ l) der rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mloLuc in den Oberschenkel neonataler Ratten. Angegeben werden die Mittelwerte für vier Versuchstiere  $\pm$  Standardabweichung.

October 1, 1996

**Chart 1:** Luciferase activity in the quadriceps f. five days after injection of  $2 \times 10^9$  p.f.u. (20  $\mu$ l) of the recombinant adenoviruses Ad-Luc, Ad-rsvLuc, and Ad-mlcLuc into the upper thigh of neonatal rats. The average values for four test animals  $\pm$  standard deviations are shown.

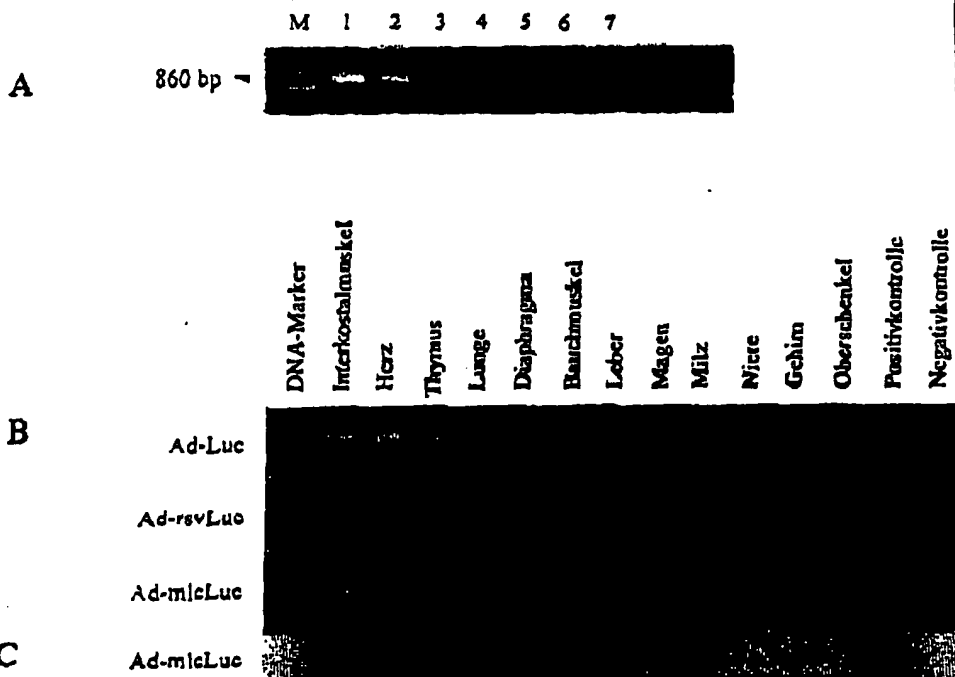


Abbildung 4 : Nachweis der adenoviralen DNA in 12 verschiedenen Geweben nach intrakavitärer Injektion der rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-micLuc. (A) Das Agarosegel (2.4%) zeigt das spezifische 860 bp PCR Produkt, das durch Amplifikation von abnehmenden Mengen Adde1324 DNA erzeugt wurde. Als Probe wurden 100 ng genomische DNA der Ratte gemischt mit Adde1324 DNA eingesetzt: 10 pg (Spur 1); 1 pg (Spur 2), 100 fg (Spur 3); 10 fg (Spur 4); 1 fg (Spur 5); 0.1 fg (Spur 6); keine virale DNA (Spur 7). M-DNA-Marker (100 bp Leiter). (B) Das Agarosegel (2.4%) zeigt das 860 bp PCR-Produkt, amplifiziert aus 100 ng genomischer DNA, welche aus den angegebenen Geweben nach intrakavitärer Injektion von Ad-Luc (oben), Ad-rsvLuc (mitte) und Ad-micLuc (unten) isoliert worden war. Ein PCR Ansatz mit 100 ng genomischer DNA der Ratte gemischt mit 1 pg Adde1324 DNA diente als Positivkontrolle, ein Ansatz ohne Adde1324 DNA als Negativkontrolle. (C) Southern Blot-Analyse des Ad-micLuc infizierten Tieres in (B). Als Sonde wurde das <sup>32</sup>P-markierte 860 bp PCR Produkt aus einem Kontrollansatz verwendet.

October 1, 1996

**Fig. 4:** Verification of adenoviral DNA in 12 different tissues after intracavitary injection of the recombinant adenoviruses Ad-Luc, Ad-rsvLuc, and Ad-mlcLuc. (A) The agarose gel (2.4%) shows the specific 860 bp PCR product, which was generated by amplification of decreasing quantities of Addel324 DNA. For a test sample, 100 ng of genomic DNA of the rat mixed with Addel324 DNA was used: 10 pg (trace 1); 1 pg (trace 2); 100 fg (trace 3); 10 fg (trace 4); 1 fg (trace 5); 0.1 fg (trace 6); no viral DNA (trace 7); M-DNA-marker (100 bp leader). (B) The agarose gel (2.4%) shows the 860 bp PCR product, amplified from 100 ng genomic DNA that had been isolated from the cited tissue after intracavitary injection of Ad-Luc (top), Ad-rsvLuc (middle), and Ad-mlcLuc (bottom). A PCR base with 100 ng genomic DNA of the rat mixed with 1 pg Addel324 DNA served as positive control, a base without Addel324 DNA as negative control. (C) Southernblot analysis of the Ad-mlcLuc-infected animals of (B). The 860 bp PCR product marked  $^{32}\text{P}$  from a control base was used as probe.

(Legend (from left to right): DNA marker, intercostal muscle, heart, thymus, lung diaphragm, abdominal muscle, liver, stomach, spleen, kidney, brain, upper thigh, positive control, negative control).

## References

- 1 [redacted] Congenital heart disease in adults. In: Braunwald E (ed). *Heart Disease*. Saunders: Philadelphia, 1992, pp 1810-1826.
- 2 Towbin JA et al. X-linked dilated cardiomyopathy. Molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation* 1993; 87: 1854-1865.
- 3 Franz WM et al. X-linked dilated cardiomyopathy: novel mutation of the dystrophin gene. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 752: 470-491.
- 4 Kass-Eisler A et al. Quantitative determination of adenovirus-mediated gene delivery to rat cardiac myocytes *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11498-11503.
- 5 Guzman RJ et al. Efficient gene transfer into myocardium by direct injection of adenovirus vectors. *Circ Res* 1992; 73: 1202-1207.
- 6 Barr E et al. Efficient catheter-mediated gene transfer into the heart using replication defective adenovirus. *Gene Therapy* 1994; 1: 51-58.
- 7 Kirshenbaum LA et al. Highly efficient gene transfer into adult ventricular myocytes by recombinant adenovirus. *J Clin Invest* 1993; 92: 381-387.
- 8 Chanock RM et al. Immunization by selective infection with type 4 adenovirus in human diploid tissue cultures. I. Safety and lack of oncogenicity and tests for potency in volunteers. *J Am Med Assoc* 1966; 198: 443-452.
- 9 Yang Y et al. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenovirus for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4407-4411.
- 10 Krougliak V, Graham FL. Development of cell lines capable of complementing E1, E4 and protein IX defective adenovirus type 5 mutants. *Hum Gene Ther* 1995; 6: 1575-1586.
- 11 Wang Q, Jia XC, Finer, MH. A packaging cell line for propagation of recombinant adenovirus containing two lethal gene-region deletions. *Gene Therapy* 1995; 2: 775-783.
- 12 Yeh P et al. Efficient dual transcomplementation of adenovirus E1 and E4 regions from a 293-derived cell line expressing a minimal E4 functional unit. *J Virol* 1996; 70: 339-365.
- 13 Engelhardt JF, Ye X, Dorans B, Wilson JM. Ablation of E2a in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6196-6200.
- 14 Yang Y et al. Inactivation of E2a in recombinant adenoviruses improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis. *Nat Genet* 1994; 7: 362-369.
- 15 Stratford-Perricaudet LD, Makeh I, Perricaudet M, Briand P. Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscles and heart. *J Clin Invest* 1992; 90: 626-630.
- 16 Huard J et al. The route of administration is a major determinant of the transduction efficiency of rat tissues by adenovirus recombinants. *Gene Therapy* 1995; 2: 107-113.
- 17 Kass-Eisler A et al. The impact of developmental stage, route of administration and the immune system on adenovirus mediated gene transfer. *Gene Therapy* 1994; 1: 395-402.
- 18 Franz WM et al. Heart-specific targeting of firefly luciferase by the myosin light chain-2 promoter and developmental regulation in transgenic mice. *Circ Res* 1993; 73: 629-638.
- 19 Lee KJ et al. Myosin light chain-2 luciferase transgenic mice reveal distinct regulatory programs for cardiac and skeletal muscle-specific expression of a single contractile protein gene. *J Biol Chem* 1992; 267: 15875-15885.
- 20 Lee JL, Hickey R, Zhu H, Chien KR. Positive regulatory elements (HF-1a and HF-1b) and a novel negative regulatory element (HF-3) mediate ventricular muscle-specific expression of myosin light-chain 3-luciferase fusion genes in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 1220-1229.
- 21 Zou Y, Chien KR. EF1 $\alpha$ /YB-1 is a component of cardiac HF-1A binding activity and positively regulates transcription of the myosin light-chain 2v gene. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2972-2982.
- 22 Yu Y-T et al. Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors. *Genes Dev* 1992; 6: 1783-1798.
- 23 Zhu H et al. A novel, tissue-restricted zinc finger protein (HF-1b) binds to the cardiac regulatory element (HF-1b/HF-2) within the rat myosin light chain-2 gene. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 4432-4444.
- 24 Zhu H et al. A conserved 28-base-pair element (HF-1) in the rat cardiac myosin light-chain-2 gene confers cardiac-specific and alpha-adrenergic-inducible expression in cultured neonatal rat myocardial cells. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 2273-2281.
- 25 Overbeek PA, Lai SP, Van Quill KR, Westphal H. Tissue-specific expression in transgenic mice of a fused gene containing RSV terminal repeats. *Science* 1986; 231: 1574-1577.
- 26 Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; 36: 59-74.
- 27 Wei JR et al. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 723-737.
- 28 Hearing P, Shenk T. The adenovirus type 5 E1A transcriptional control region contains a duplicated enhancer element. *Cell* 1983; 33: 693-703.
- 29 Hearing P, Samuels RJ, Wishart WL, Shenk T. Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome. *J Virol* 1987; 61: 2355-2358.
- 30 Henderson SA et al. Structure, organization, and expression of the rat cardiac myosin light chain-2 gene. *J Biol Chem* 1989; 264: 1842-1848.
- 31 Acadi G et al. A differential efficiency of adenovirus-mediated *in vivo* gene transfer into skeletal muscle cells of different maturity. *Hum Mol Gen* 1994; 3: 579-584.
- 32 Razot T et al. Efficient adenovirus-mediated transfection of

+49-4509-7002

Myocardial gene delivery by adenoviral shuttle vector  
T Rothmann et al

8

- minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. *Nature* 1993; 361: 647-650.
- 33 Vincent N et al. Long-term correction of mouse dystrophic degeneration by adenovirus-mediated transfer of a minidystrophin gene. *Nat Genet* 1993; 3: 130-134.
- 34 Quantin B, Perricaudet LD, Tajbakhsh S, Mandel JL. Adenovirus as an expression vector in muscle cells *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2581-2584.
- 35 Bessereau JL et al. *In vivo* and *in vitro* analysis of electrical activity-dependent expression of muscle acetylcholine receptor genes using adenovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1304-1308.
- 36 Jin Y et al. Effect of enhancer sequences on ventricular myosin light chain-2 promoter activity in heart muscle and nonmuscle cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; 210: 260-266.
- 37 Johns DC et al. Adenovirus-mediated expression of a voltage-gated potassium channel *in vitro* (rat cardiac myocytes) and *in vivo* (rat liver). *J Clin Invest* 1993; 96: 1152-1158.
- 38 Zhang WW, Koch PE, Roth JA. Detection of wild-type contamination in a recombinant adenoviral preparation by PCR. *BioTechniques* 1995; 18: 444-447.
- 39 Sen A et al. Terminally differentiated neonatal rat myocardial cells proliferate and maintain specific differentiated functions following expression of SV40 large T antigen. *J Biol Chem* 1988; 263: 19132-19136.
- 40 Ausbel FM et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene and Wiley: New York, 1989.
- 41 Gossler A, Zachgo J. Gene and enhancer trap screens in ES cell chimeras. In: Joyner AL (ed). *Gene Targeting*. Oxford University Press, 1993, pp 181-225.

October 1, 1996

### Further description of the invention

The cloning of the *mlc-2*/luciferase fusion construct was done as follows:

The plasmid pAd-*mlcLuc* is derived from the plasmid pAd-RSV $\beta$ gal (Stratford Perricaudet, 1992). In order to produce pAd-*mlcLuc* plasmid, the *Bam*H1/*Kpn*I *mlc*-luciferase fragment (circa 0.8 kb myosin light chain-2v promoter and 1.8 kb luciferase gene) from pMLCL $\Delta$ 5' plasmid (Henderson, 1989) was cloned directly into the *Bam*H1/*Kpn*I sites of the pAd-RSV $\beta$ gal plasmid. Fig. 1 is a schematic illustration of the plasmid.

**Fig. 1** (second instance): Schematic illustration of the constructed pAd-*mlcLuc* plasmid (8.5 kb). The restriction interfaces for *Bam*H1, *Kpn*I and *Hind*III are indicated (ITR = inverted terminal repeats;  $\psi$  = packaging sequence; *mlc-2* - myosin light chain-2v promoter; Ad 9.4-18 m.u. - adenoviral sequence of 9.4 to 18 map units of adenovirus type 5; ori/ampR = origin of replication / ampicillin resistance gene).

October 1, 1996

to 7) 1. It was correctly noted that the heart muscle-specific gene expression of the *mlc-2* promoter is shown in literature lines D1-D3. However, the heart muscle-specific gene expression was shown only in transient transfection experiments with plasmid vectors and for transgenic animals, and not for adenoviral vectors. How the tissue-specificity of a promoter in adenoviral vectors reacts is, in principle, unpredictable. Since the E1A enhancer is still present in recombinant adenoviruses (it overlaps with the packaging sequence  $\psi$  and, therefore, can not be deleted (lit.)), interference with the inserted promoter enhancer can occur. In literature line D4, the heart muscle-specific *cTNC* promoter is mentioned, among others, to be used for a heart muscle-specific gene transfer. Neither the tissue specificity of *cTNC* nor of any other heart muscle-specific promoter in the adenoviral shuttle vector system has been proven to date. The *mlc-2* promoter examined by us is to date the only promoter for which a heart muscle-specific gene expression has been shown. That the selection of a tissue-specific promoter for a tissue-specific gene transfer by adenoviral vectors is not trivial and can only be found after sufficient search is demonstrated in two examples.

Example 1: The smooth muscle-specific *smmhc*-promoter is inactive in the adenoviral shuttle vector system.

*Kallmeier et al.* (1995) was able to show that the 1225 bp smooth muscle myosin heavy chain *smmhc* promoter of the rabbit was specifically active in smooth muscle cells. Compared to a negative control without a promoter, the 1225 bp *smmhc* promoter achieved an 18-fold background luciferase activity. Recently, our team could also demonstrate the specificity of the gene

October 1, 1996

expression in transgenic mice. In the adenoviral vector system, we were unable to prove specific activity of the 1225 bp smmhc promoter in smooth muscle cells. In Fig. 2, the results of the infections are illustrated. The luciferase activity was determined in neonatal cardiomyocytes, neonatal smooth vascular muscle cells and adult smooth vascular muscle cells after infection with Ad-Luc, Ad-rsvLuc, Ad-mlcLuc and Ad-smmhcLuc. The infection was carried out under standard conditions with a multiplicity of infection of 10. 48 hours after the infection, the luciferase activity in the cells was determined. The highest luciferase activity (RLU/ $\mu$ g protein) was measured in neonatal cardiomyocytes infected with lysate Ad-rsvLuc. It measured 300-900 times more than in lysates of smooth vascular muscle cells (Fig. 1). The luciferase activity of the promoter-free negative control Ad-Luc was 12-45 times higher in neonatal cardiomyocytes than in adult and neonatal smooth vascular muscle cells (Fig. 1). The luciferase activity of neonatal and adult smooth vascular muscle cells infected with Ad-smmhcLuc was 3-4 times lower than that of the promoter-free Ad-Luc control. Therefore, Ad-smmhcLuc is inactive in smooth vascular muscle cells. In neonatal cardiomyocytes, the luciferase activity of Ad-mlcLuc was 21 times higher than of Ad-Luc, and 129 times higher than of Ad-smmhcLuc. In contrast, in neonatal and adult smooth vascular muscle cells the luciferase activity induced by Ad-mlcLuc was 3-4 times lower than the one induced by Ad-Luc, and two times lower than the one induced by Ad-smmhcLuc. Consequently, Ad-mlcLuc is specifically active in neonatal cardiomyocytes and achieves, compared to Ad-rsvLuc, 8% of the luciferase activity induced in neonatal cardiomyocytes. It has been shown that the mlc-2 promoter is active in neonatal cardiomyocytes, whereas the expected activity of the smmhc

October 1, 1996

promoter in neonatal and adult smooth muscle cells did not materialize.

The results for the *smmhc* promoter have so far not been made public, mainly because the results are negative ones. One can assume that several muscle-specific promoters in adenoviruses have already been tested and have not been published because of a lack of evidence of specific expression. Thus, the demonstration of heart muscle-specific gene expression with the *cTNC* promoter, that is, the smooth muscle-specific gene expression with the endothelin promoter by *Leiden* is still pending. Therefore, we do not think it trivial to characterize a tissue-specific promoter that is useful in a muscle-specific, in the case at hand a heart muscle-specific, gene transfer. For this reason, we consider the evidence of heart muscle-specific gene expression with the *mlc-2* promoter in the adenoviral shuttle vector system an inventive activity.

01.10.96

26-09-96 09:15

Dr. Wolfgang-M. Franz

+49-4509-71002

S09

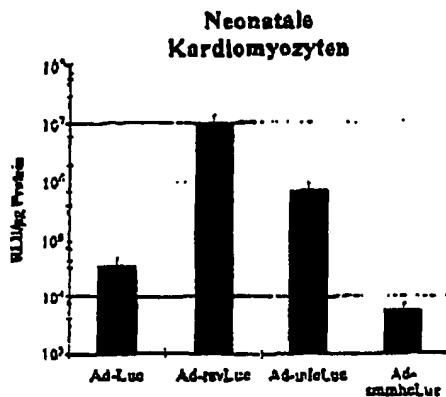
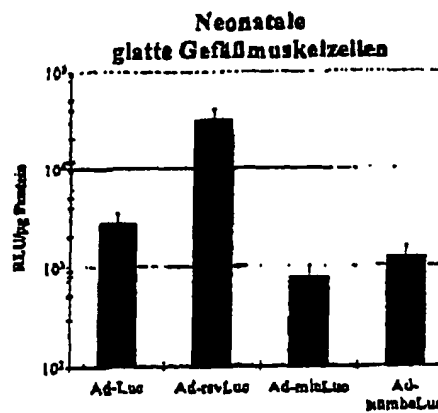
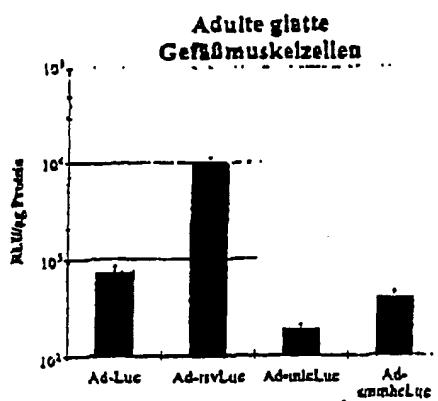


Abbildung 2: Gemessene Luciferaseaktivitäten („Relative Light Units“ (RLU)/µg Protein) nach Infektion von adulten glatten Gefäßmuskelzellen, neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen und neonatalen Kardiomyozyten der Ratte mit den rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-revLuc, Ad-micLuc und Ad-ammhLuc. Die Luciferaseaktivität wurde 48 h nach der Infektion (m.o.i. 10) bestimmt. Jede Säule steht für den Mittelwert aus vier Experimenten. Der mittlere Balken gibt die Standardabweichung des Mittelwertes an. Beachte den veränderten Maßstab für neonatale Kardiomyozyten.

October 1, 1996

**Fig. 2** (second instance): Measured luciferase activity (Relative Light Units (RLU)/ $\mu$ g protein) after infection of adult smooth vascular muscle cells, neonatal smooth vascular muscle cells, and neonatal cardiomyocytes of the rat with the recombinant adenoviruses Ad-Luc, Ad-rsvLuc, Ad-mlcLuc, and Ad-smmhLuc. The luciferase activity was determined 48 hours after the infection (m.o.i. 10). Each column illustrates the average value from four experiments. The bar in the middle indicates the standard deviation of the average value. Note the altered scale for neonatal cardiomyocytes.

(Legend: Top left: adult smooth vascular muscle cells; top right: neonatal smooth vascular muscle cells; bottom left: neonatal cardiomyocytes).

October 1, 1996

Example 2: the  $\alpha$ mhC promoter is only insufficiently heart muscle-specific in the adenoviral vector system.

In a second example, the outstanding specificity of the mlc-2 promoter is to be illustrated. For this, we constructed a recombinant adenovirus (Ad-mhCLuc), whereby the dddd (*circled and exclamation mark added by hand*) bp  $\alpha$ mhC promoter of the rat controlled the expression of the luciferase reporter gene. In Fig. 3 a, b, the results of the injection of the recombinant adenovirus Ad-mhCLuc and Ad-mlcLuc in the heart chamber of neonatal rats are illustrated. After intracavitary injection of approximately  $2 \times 10^9$  plaque-forming units of the recombinant adeneo virus Ad-mhCLuc (3a) and Ad-mlcLuc (3b) into the left main chamber, the highest luciferase activity in the heart could be verified for both viruses. It is to be noted that Ad-mlcLuc was 3-4 times more active in the heart than was Ad-mhCLuc. In all other tissue, the luciferase activity induced by Ad-mhCLuc was higher than the one induced by Ad-mlcLuc. In Fig. 3c, the ratio of the luciferase activity of Ad-mhCLuc and Ad-mlcLuc is illustrated. It is obvious that Ad-mhCLuc is 2-10 time more active in the kidney, spleen, liver, diaphragm, lung and intercostal muscle than is Ad-mlcLuc. This shows that the mlc-2 promoter in the adenoviral vector system limits the expression of the luciferase considerably more to the heart than does the  $\alpha$ mhC promoter. Additionally, the mlc-2 promoter is substantially more active in the heart than is the  $\alpha$ mhC promoter.

Since the mlc-2 promoter is, to date, the only promoter in the adenoviral shuttle vector system that is able to express a foreign gene specifically in the heart, we want to claim it as a

October 1, 1996

surpassing advantage over the state of the art.

25-09-96 00:15

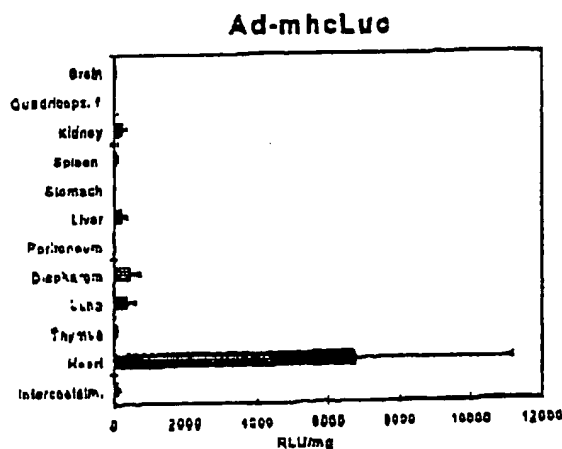
Dr. Wolfgang-M. Franz

01.10.96

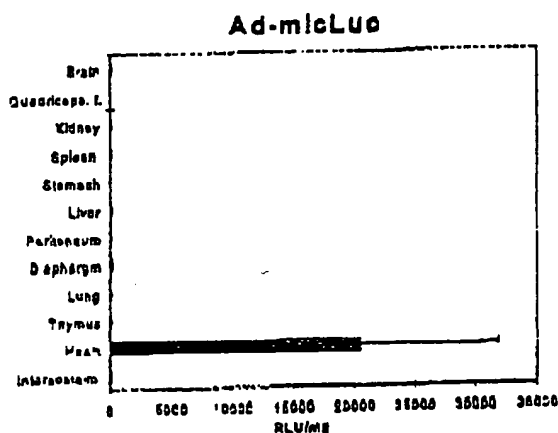
+49-89-71002

S10

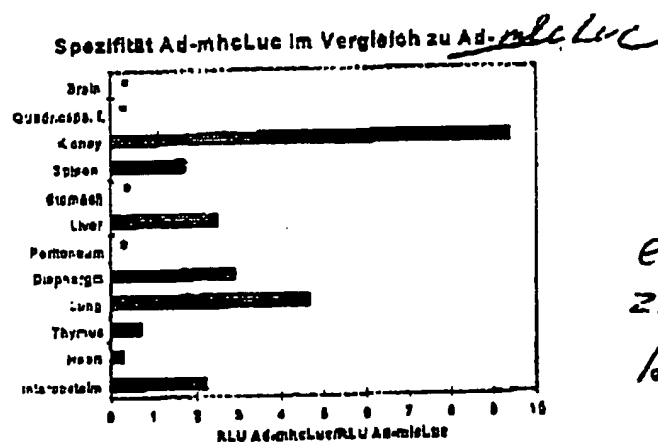
a)



b)



c)



evtl. Relation  
zu Background  
Ad/Luc

Abbildung 3:: Dargestellt wird die erzielte Luciferaseaktivität (RLU/mg Gewebe) nach intrakavitärer Injektion von ca.  $2 \times 10^9$  plaque forming units (Plauebildende Einheit) des rekombinanten Adenovirus Ad-mhcLuc (a) und Ad-micLuc (b) in die linke Hauptkammer neonataler Ratten. Beide Viren zeigen die höchste Luciferaseaktivität im Herzen. Ad-micLuc ist 3-4 mal aktiver im Herzen als Ad-mhcLuc. In (c) wird die relative Luciferaseaktivität von Ad-mhcLuc in den verschiedenen Geweben zu der Luciferaseaktivität von Ad-micLuc ins Verhältnis gesetzt. Es wird deutlich, daß Ad-mhcLuc in der Niere, Milz, Leber, Diaphragma, Lunge und Interkostalmuskel 2-10 fach aktiver ist als Ad-micLuc (\* = RLU von Ad-mhcLuc ist kleiner als 50 RLU/mg Gewebe und wird daher nicht für die Auswertung berücksichtigt).

October 1, 1996

**Fig. 3** (second instance): Illustrated is the achieved luciferase activity (RLU/mg tissue) after intracavitary injection of approximately  $2 \times 10^9$  plaque-forming units of the recombinant adenovirus Ad-mhcLuc (a) and Ad-mlcLuc (b) into the left ventricle of neonatal rats. Both viruses show the highest luciferase activity in the heart. Ad-mlcLuc is 3-4 times more active in the heart than Ad-mhcLuc. In (c), the relative luciferase activity of Ad-mhcLuc in the various tissues is shown in relation to the luciferase activity of Ad-mlcLuc. It is obvious that in the kidney, spleen, liver, diaphragm, lung and intercostal muscle Ad-mhcLuc is 2-10 times more active than Ad-mlcLuc (\* = RLU of Ad-mhcLuc is below 50 RLU/mg tissue and was, therefore, not considered in this evaluation).

(heading of bottom diagram: Specificity Ad-mhcLuc compared to Ad-mlcLuc)

(Note: Handwritten note is illegible.)

October 1, 1996

to 7) 2. In the patent of *Leiden* and *Barr* (D4), the use of a heart muscle-specific promoter for a specific gene expression in the heart is suggested. A gene expression, which remains limited to the ventricle of the heart was not stated in D4. Recently, we were able to show that by using the *mlc-2* promoter, a ventricle-specific gene expression after adenoviral gene transfer with Ad-*mlcLuc* can be achieved (Fig. 4). After injection of the recombinant adenoviruses Ad-*rsvLuc*, Ad-*mlcLuc*, Ad-*mhcLuc* and Ad-*Luc*, a gene expression limited to the ventricle was determined only for Ad-*mlcLuc* (Note: *handwritten insert is illegible*). The ratio of the luciferase activity of Ad-*mlcLuc* in the ventricle to the atrium was approximately 30, while it was 1-2 for all other viruses (see Fig. 4). A gene transfer limited to the ventricle is of great benefit. Thus, it is theoretically possible to specifically increase the contraction force of the ventricle with therapeutic genes. This, for hemodynamic considerations, has a number of advantages...Therefore, the adenovirus Ad-*mlcLuc* has a number of advantages over the method claimed in D4. For this reason, we consider the establishment of our vector system an inventive activity.

25-09-96 00:15

Dr. Wolfgang-M. Franz

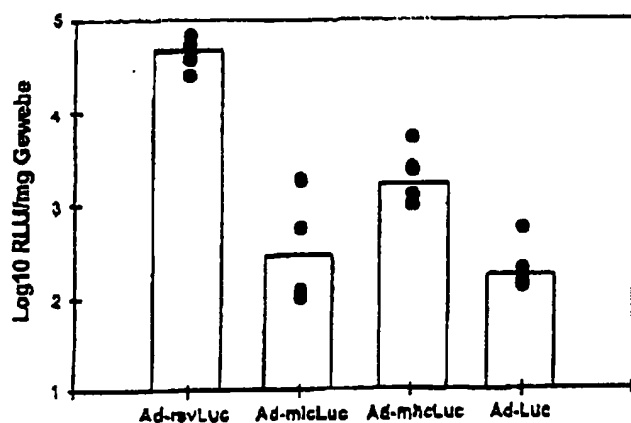
01.10.96

+49-49-2730694

S12

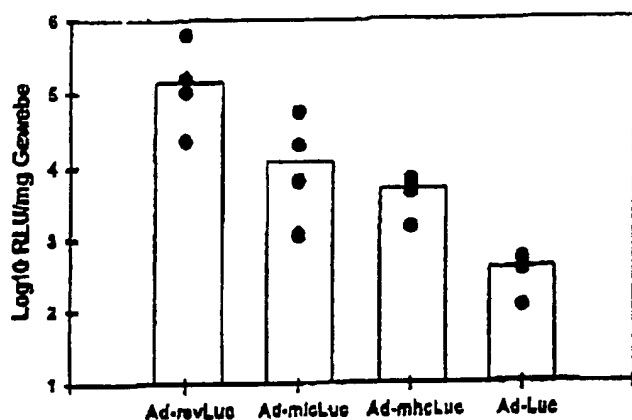
a)

## Atrium



b)

## Ventrikel



c)

## Ventrikel/Atrium

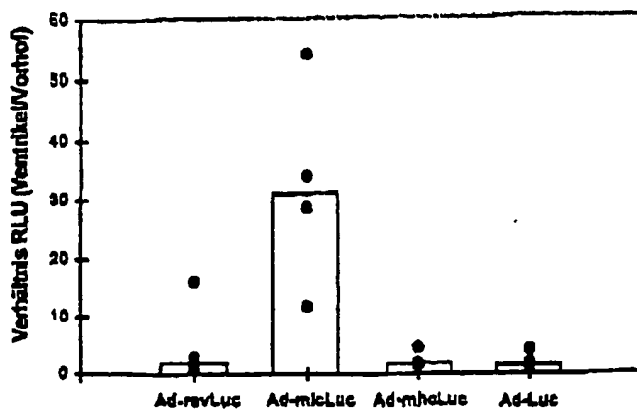


Abbildung 4: Luciferaseaktivität im Atrium (a) und Ventrikel (b) nach Injektion der rekombinanten Adenoviren Ad-rsvLuc, Ad-micLuc, Ad-mhcLuc und Ad-Luc.  $2 \times 10^9$  p.f.u. in einem Volumen von 20-40  $\mu$ l wurden in den linken Ventrikel neonataler Ratten injiziert. Die Gewebe wurden fünf Tage nach der Injektion analysiert. Die Luciferaseaktivität wird gemessen in „Relative Light Unit“ (RLU)/mg Gewebe (Naßgewicht). Die Säulen zeigen den Median aus vier Experimenten an, die Punkte geben die Ergebnisse der Versuchstiere an. (c) Verhältnis der Luciferaseaktivität (RLU) im Ventrikel und Vorhof. Die Punkte geben die Verhältnisse der Aktivitäten im Ventrikel und Vorhof für ein Tier an. Der Balken gibt den Median an.

für 4...

October 1, 1996

**Fig. 4** (*second instance*): Luciferase activity in the atrium (a) and ventricle (b) after injection of the recombinant adenoviruses Ad-rsvLuc, Ad-mlcLuc, Ad-mhcLuc and Ad-Luc.  $2 \times 10^9$  p.f.u. at a volume of 20-40  $\mu$ l were injected into the left ventricle of neonatal rats. The tissue was analyzed five days after the injection. The luciferase activity is measured in relative light units (RLU)/mg tissue (wet weight). The columns illustrate the average of four experiments, the dots indicate the results of the lab animals (c). Ratio of the luciferase activity (RLU) in the ventricle and the atrium. The dots show the ratio of the activities in the ventricle and the atrium of an animal. The bar indicates the average.

(Side legend: Top: Log 10 RLU/mg tissue; middle: Log 10 RLU/mg tissue; bottom: ratio RLU (ventricle/atrium)).

October 1, 1996

11. Vector system according to claim 1, characterized by a gene shuttle based on a lipofection.

12. Vector system according to claims 1-6, characterized in that for a therapeutic gene the cDNA of a gene is used, which is altered, qualitatively or quantitatively, for the disease to be treated.

13. Vector system according to claims 1-7, characterized in that the ventricular MLC-2 promoter is used as fusion construct with luciferase.

14. Vector system according to claims 1-8, characterized in that the MLC2/luciferase fusion construct is generated by cloning the BamHI/KpnI MLC luciferase fragment (circa 0.8 kb myosin light chain 2v-promoter and 1.8 kb luciferase gene) from plasmid pMLCL 5'directly into the BamHI/KpnI interfaces of the plasmid pAd-RSV $\beta$ gal.

15. Vector system according to claims 1-9, characterized in that parts or variants of the MLC-2 promoter are applied.

16. Method for generating the vector system according to claims 1-10, characterized in that in an adenoviral vector the E1 gene region or another region is replaced by a therapeutic gene with the MLC-2 promoter.